

Lázaro Antonio Campanha Novaes

**FREQUÊNCIA E IMPACTO CLINICOPATOLÓGICO DE REARRANJOS ONCOGÊNICOS (*ALK*, *RET*
E *ROS1*) EM PACIENTES BRASILEIROS COM CÂNCER DE PULMÃO NÃO-PEQUENAS CÉLULAS
WILDTYPE PARA *EGFR* E *KRAS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rui Manuel Reis

Co-orientador: Dra. Letícia Ferro Leal

Barretos

2019

Lázaro Antonio Campanha Novaes

**FREQUÊNCIA E IMPACTO CLINICOPATOLÓGICO DE REARRANJOS ONCOGÊNICOS (*ALK*, *RET*
E *ROS1*) EM PACIENTES BRASILEIROS COM CÂNCER DE PULMÃO NÃO-PEQUENAS CÉLULAS
WILDTYPE PARA *EGFR* E *KRAS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Rui Manuel Reis

Co-orientador: Dra. Letícia Ferro Leal

Barretos

2019

N935f Novaes, Lázaro Antonio Campanha.

Frequência e impacto clinicopatológico de rearranjos oncogênicos (ALK, RET E ROS1) em pacientes brasileiros com câncer de pulmão não-pequenas células WILDTYPE para EGFR e KRAS. / Lázaro Antonio Campanha Novaes. - Barretos, SP 2019.

116 f. : il.

Orientador: Rui Manuel Vieira Reis.

Coorientadora: Letícia Ferro Leal.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2019.

1. Câncer de pulmão não-pequenas Células. 2. Medicina personalizada. 3. NanoString. 4. ALK/RE/ROS1. 5. Alvos terapêuticos. I. Autor. II. Reis, Rui Manuel Vieira. III. Leal, Letícia Ferro. IV. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

SUORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Ministério Público do Trabalho em Campinas – PRT 15ª Região por meio de financiamento de pesquisa e do Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP) do Hospital do Câncer de Barretos por meio de bolsa institucional de auxílio à pesquisa.

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas, não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB) do Hospital de Câncer de Barretos tenha auxiliado nas análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis pela orientação desta dissertação e pelos ensinamentos compartilhados em todas as etapas do estudo, contribuindo muito para minha formação acadêmica e profissional. Obrigado pela oportunidade de realizar este estudo.

À Prof. Dra. Letícia Ferro Leal pelo seu apoio, orientação e dedicação não apenas comigo, mas com todos os seus alunos. Agradeço por ensinar a como se tornar um ótimo pesquisador e contagiar-nos com seu entusiasmo pela pesquisa. E obrigado por todo o tempo gasto com conselhos, tanto sobre a vida profissional quanto a pessoal, principalmente nos momentos difíceis pelos quais passei durante a elaboração deste estudo.

Aos assessores externo e interno, o Prof^o Dr. Ramon Andrade de Mello e Prof^o Dr. Matias Melendez, pelas valiosas contribuições e ensinamentos durante as bancas de acompanhamento e qualificação desta dissertação.

Ao Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de BarRETos por incentivar a pesquisa, e pelo auxílio para a continuidade deste estudo.

Ao NEB (Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística) pelo auxílio durante a realização das análises estatísticas deste estudo.

À secreTaria do Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio-XII pela seriedade e eficiência na realização de seus trabalhos, juntamente com a Comissão de Residência Multiprofissional pela criação do Programa de Incentivo ao Mestrado Acadêmico aos Residentes (PRISMA), que permitiu que eu realizasse este estudo.

Aos companheiros de laboratório e biólogos que se fizeram presentes durante toda a minha trajetória, em especial Guilherme, a Gabriella e o Tiago, meus queridos companheiros de residência.

À Dra. Luciane Sussuchi por sua ajuda com a parte de bioinformática deste trabalho.

A todos os colegas e amigos do grupo GTO (Grupo Translacional em Oncologia Pulmonar) que sempre me ajudaram, em especial ao Rodrigo e a Maria Fernanda pela amizade ao longo do mestrado.

E em especial à minha amada mãe Nena, pelo incentivo, companheirismo, compreensão, amor, não apenas durante o mestrado, mas por todos os anos juntos nessa longa caminhada.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King Jr.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia do Câncer de Pulmão	1
1.2	Fatores de risco	3
1.3	Diagnóstico, Estadiamento e Prognóstico do Câncer de Pulmão	4
1.4	Tratamento	5
1.5	Histologia	6
1.6	Aspectos moleculares do câncer de pulmão	7
1.6.1	<i>EGFR</i>	9
1.6.2	<i>KRAS</i>	9
1.6.3	<i>Rearranjos Gênicos em Câncer de Pulmão Não-pequenas Células</i>	10
1.6.4	<i>ALK</i>	11
1.6.5	<i>RET</i>	12
1.6.6	<i>ROS1</i>	13
1.7	Ancestralidade	14
1.8	Métodos de Detecção de Rearranjos Gênicos	15
1.8.1	<i>Imunohistoquímica (IHQ)</i>	15
1.8.2	<i>Fluorescence in situ hybridization (FISH)</i>	16
1.8.3	<i>qPCR (Real-time Polymerase Chain Reaction)</i>	17
1.8.4	<i>Next Generation Sequencing (NGS)</i>	17
1.8.5	<i>Tecnologia nCounter® (plataforma NanoString)</i>	18
2	JUSTIFICATIVA	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo geral	22
3.2	Objetivos específicos	22
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	Casuística e Coleta de Dados	23
4.2	Processamento das amostras – Extração de RNA	23
4.3	Análise Molecular – Detecção de rearranjos nos genes <i>ALK</i> , <i>RET</i> e <i>ROS1</i>	24
4.4	Confirmação dos rearranjos pelos métodos de IHQ, FISH e NGS	26
4.4.1	<i>Imunohistoquímica (IHQ)</i>	26
4.4.2	<i>Hibridização fluorescente in situ (FISH)</i>	26
4.4.3	<i>Next Sequencing Generation (NGS)</i>	26
4.5	Análise de Ancestralidade	28

4.6	Análise dos dados	28
5.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	29
6.	RESULTADOS	30
6.1	Características dos pacientes e desfecho clínico	30
6.2	Análise univariada de Sobrevida Global	32
6.3	Detecção dos rearranjos gênicos	38
6.3.1	ALK	38
6.3.2	<i>Validação dos rearranjos ALK (IHQ)</i>	39
6.3.3	<i>Rearranjos ALK e associação com variáveis clínico-patológicas</i>	39
6.3.4	<i>RET</i>	42
6.3.5	<i>Confirmação dos rearranjos RET (FISH)</i>	43
6.3.6	<i>ROS1</i>	44
6.3.7	<i>Confirmação dos rearranjos ROS1 (FISH)</i>	44
6.4	Análise de Ancestralidade	46
6.5	Análise Multivariada de características clinicopatológicas e desfecho clínico dos pacientes	49
6.6	Análise Multivariada de características clinicopatológicas e rearranjos do gene ALK	50
8	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	Anexo A – Ficha de Coleta	71
	Anexo B – Carta Aprovação CEP	92
	Anexo C – Artigo Científico	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos e mortalidade para os cinco tipos de câncer mais incidentes e que levam a óbito globalmente ¹	1
Figura 2. Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2018 por sexo. Dados INCA, 2018. *Exceto caso de pele não melanoma ²	2
Figura 3. Infográfico do número de novos casos de câncer de pulmão em 2017, no Hospital de Câncer de Barretos. Dados gerados pelo departamento de Registro Hospitalar HCB.	2
Figura 4. Gráficos representando o estadiamento clínico (A) e a sobrevida global em 5 anos (B) dos casos de câncer de pulmão admitidos no Hospital de Amor.....	3
Figura 5. Classificação histológica do câncer de pulmão.....	7
Figura 6. Representação gráfica de alterações moleculares (mutações / rearranjos) encontradas em casos CPNPC e seus respectivos fármacos inibidores. Adaptado de Hirsch et al, 2017 ²⁶	8
Figura 7. Representações esquemáticas da formação de rearranjos gênicos por (A) Translocação, (B) Inserções, (C) Deleções, (D) Duplicações, (E) Inversões, (F) Cromotripsia ³⁵	10
Figura 8. Representação integrada das vias de sinalização alteradas pelos rearranjos gênicos e terapias-alvo disponíveis.....	11
Figura 9. Epidemiologia molecular do câncer de pulmão de células não pequenas na América do Norte, Europa e Ásia ⁸¹	15
Figura 10. Expressão de ALK em CPNPC. (A) Adenocarcinoma pulmonar de padrão acinar negativo para expressão de rearranjo do gene ALK. (B) Adenocarcinoma pulmonar de padrão acinar positivo para expressão de rearranjo do gene ALK. Adaptado de Oliveria et al, 2019 ⁸⁴	16
Figura 11. Representação da identificação da presença rearranjos do gene ALK nas células tumorais. (A) Ausência de rearranjos, sondas break-apart bem próximas entre si. (B) Presença de rearranjos, com espaçamento entre as sondas break-apart. (C) Esquemas das sonda.....	17
Figura 12. Princípios da plataforma NanoString para identificação e quantificação de alvos moleculares.....	19
Figura 13. Fluxo de trabalho resumido da metodologia NanoString.....	25
Figura 14. Fluxo de trabalho do protocolo de sequenciamento do kit comercial Archer® FusionPlex® Lung.....	27
Figura 15. Fluxo de trabalho das principais etapas do presente projeto. * Dados previamente publicados ¹⁰	29
Figura 16. Esquema representativo do fluxo de amostras desde a separação das amostras no diagnóstico molecular, verificação de disponibilidade de bloco de parafina na patologia até a inclusão dos pacientes e detecção dos rearranjos gênicos.....	30

Figura 17. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com câncer de pulmão não-pequenas células EGFR/KRAS-wildtype (OS mediana = 12,8 meses).....	32
Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC EGFR/KRAS-wildtype de acordo com estadiamento ao Diagnóstico. O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.	33
Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC EGFR/KRAS-wildtype de acordo com a presença de metástase ao diagnóstico (A) e com o sítio de metástases ao diagnóstico doença (B). O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.....	33
Figura 20. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC EGFR/KRAS-wildtype de acordo com o emagrecimento. O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.	34
Figura 21. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC EGFR/KRAS-wildtype de acordo com o status de desempenho do ECOG na admissão do paciente. O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultado	34
Figura 22. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC EGFR/KRAS-wildtype de acordo com a ancestralidade asiática (ASN). O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.	35
Figura 23. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC EGFR/KRAS-wildtype de acordo com o sexo dos pacientes. O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.	36
Figura 24. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC EGFR/KRAS-wildtype de acordo com tabagismo. O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.	36
Figura 25. Casos CPNPC EGFR/KRAS-wildtype – Frequência rearranjos ALK. Gráfico de rearranjos do gene ALK identificados nas amostras analisadas (cut-off = 2 para rearranjos ALK) ^{96, 104} . Foram utilizados amostra controles na pesquisa dos rearranjos: Linhagem H2228 (Positiva para rearranjos ALK); Controle Horizon (controle comercial positivo para rearranjos ALK, RET e ROS1).....	38
Figura 26. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes baseado no status de rearranjos ALK (OS mediana = 12,82 meses Log Rank: p= 0,431).....	41
Figura 27. Gráfico de rearranjos do gene RET identificados nas amostras analisadas (cut-off = 5 para rearranjos RET) ^{96, 104} . Foram utilizados amostras controles na pesquisa dos rearranjos: Linhagem (Positiva para rearranjos RET); Controle Horizon (controle comercial positivo para rearranjos ALK, RET e ROS1).	42

Figura 28 Representação da hibridação in situ de casos positivos para rearranjos (A) RET (n = 2) pela plataforma NanoString (aumento de 100x). Métodos repetidos duas vezes em ambas as amostras e o resultado da análise considerado "inconclusivo" (baixa visualização do sinal de hibridação). (B) Controle para rearranjo RET.	43
Figura 29. Casos CPNPC EGFR/KRAS-wildtype – Frequência rearranjos ROS1. Gráfico de rearranjos do gene ROS1 nas amostras analisadas (cut-off = 3 para rearranjos ROS1) ^{96, 104} . Foram utilizados amostra controles na pesquisa dos rearranjos: Controle Horizon (controle comercial positivo para rearranjos ALK, RET e ROS1).	44
Figura 30. Representação da hibridação in situ do caso positivo para rearranjo (A) ROS1 (n = 1) pela plataforma NanoString (aumento de 100X). Métodos repetidos duas vezes em ambas as amostras e o resultado da análise considerado "inconclusivo" (baixa visualização do sinal de hibridação). (B) Controle ROS1.	45
Figura 31. Representação de ancestralidade genética dos casos analisados, divididos em 2 grupos (ALK positivo e ALK negativo). Os grupos ASN, AFR, EUR, AME foram usados como populações de referência. ASN, ancestralidade asiática (em azul); AFR, ancestralidade africana (em vermelho); EUR, ancestralidade europeia (em verde); AME, ancestralidade ameríndia (em amarelo).....	46
Figura 32. Representação gráfica dos estados de naturalidade e as proporções médias de ancestralidade por estado dos pacientes avaliados no presente estudo. ASN, ancestralidade asiática; AFR, ancestralidade africana; EUR, ancestralidade europeia; AME, ancestralidade ameríndia.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alterações genéticas encontradas em pacientes com CPNPC e os fármacos inibidores ¹⁵	6
Tabela 2. Lista dos parceiros conhecidos de rearranjos dos genes ALK, RET e ROS1 em CPNPC.....	14
Tabela 3. Comparação entre os métodos FISH, IHC, qRT-PCR, NGS e NanoString usados na identificação de rearranjos.....	20
Tabela 4. Painel ALK/RET/ROS1.	25
Tabela 5. Dados clínicos e sóciodemográficos dos pacientes com câncer de pulmão wildtype para EGFR e KRAS (n=148).....	31
Tabela 6. Estimativa de Sobrevida Global por método Kaplan-Meier para variáveis clínicas e moleculares da casuística (n=148).	37
Tabela 7. Análises univariada de associação entre rearranjos ALK e características clinicopatológicas dos pacientes CPNPC EGFR/KRAS-wildtype (n = 148).....	40
Tabela 8. Análises de associação entre rearranjos ALK e ancestralidade dos pacientes CPNPC EGFR/KRAS-wildtype (n = 148).....	47
Tabela 9. Estimativa de Sobrevida Global para rearranjos do gene ALK e ancestralidade (n=148)....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

IARC	<i>Internacional Agency for Research on Cancer</i>
INCA	<i>Instituto Nacional de Câncer</i>
CPPC	<i>Câncer de Pulmão de Pequenas Células</i>
CPNPC	<i>Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células</i>
OMS	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
PET – CT	<i>Positron Emission Tomography–Computed Tomography</i>
PS	<i>Performance Status</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer Lung</i>
EC	<i>Estadiamento Clínico</i>
IALT	<i>The International Adjuvant Lung Cancer Trial</i>
TKI	<i>Tyrosine Kinase Inhibitor</i>
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
BRAF	<i>V-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B</i>
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
RET	<i>Ret proto-oncogene</i>
ROS1	<i>c-ros oncogene 1</i>
MET	<i>Met proto-oncogene</i>
NTRK	<i>Neurotrophic Receptor Tyrosine</i>
HER2	<i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
MAP	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
STAT	<i>Signal Transducer And Activator Of Transcription</i>
KIF5B	<i>Kinesin Family Member 5B</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
HIP1	<i>Huntingtin Interacting Protein 1</i>
TPR	<i>Translocated Promoter Region</i>

KLC1	<i>Kinesin Light Chain 1</i>
NPM1	<i>Nucleophosmin 1</i>
CCDC6	<i>Coiled-Coil Domain Containing 6</i>
TRIM33	<i>Tripartite Motif Containing 33</i>
CUX	<i>Cut Like Homeobox</i>
EML4	<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 4</i>
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcriptase Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
IHQ	<i>Imunohistoquímica</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
CEP	<i>Comitê de Ética em Pesquisa</i>
RedCap	
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncolog</i>
CPOM	<i>Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
cDNA	<i>Complement Deoxyribonucleic Acid</i>
H&E	<i>hematoxilina e eosina</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GUSB	<i>Glucuronidase Beta</i>
OAZ1	<i>Ornithine Decarboxylase Antizyme 1</i>
POLR2A	<i>RNA Polymerase II Subunit A</i>
FFPE	<i>Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pb	<i>Pares de Base</i>
MgCl ₂	<i>Cloreto de Magnésio</i>
mM	<i>Milimolar</i>
dNTP	<i>Desoxirribonucleotídeos Fosfatados</i>
µm	<i>Micromolar</i>
°C	<i>Graus Celsius</i>
U	<i>Unidade</i>

μL	<i>Micro litro</i>
pmol	<i>Picomolar</i>
v	<i>Versão</i>
HGDP- CEPH	<i>Human Genome Diversity Cell Line Panel</i>
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solutions</i>
p	<i>Probabilidade de Significância</i>
RR	<i>Risco Relativo</i>
n	<i>Número</i>
WT	<i>Wild-type</i>
EUR	<i>Europeu</i>
AFR	<i>Africano</i>
ASN	<i>Asiático</i>
AME	<i>Ameríndio</i>
IC	<i>Intervalo de confiança</i>
SNC	<i>Sistema Nervoso Central</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
=	Igual
>	Maior
<	Menor
μ	Micro
\tilde{x}	Mediana
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
n	Número amostral
χ^2	Qui-quadrado

RESUMO

Novaes LAC. Frequência e impacto clinicopatológico de rearranjos oncogênicos (*ALK*, *RET* e *ROS1*) em pacientes brasileiros *wildtype* para *EGFR* e *KRAS* com câncer de pulmão não-pequenas células. Dissertação (Mestrado). Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2019.

JUSTIFICATIVA: O desenvolvimento de terapias-alvo para os rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1* revolucionou o tratamento de pacientes com câncer de pulmão. Os estudos de genômica em larga escala permitiram identificar a frequência destes rearranjos em diversas etnias. Entretanto, informações sobre a frequência dos rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1* em populações miscigenadas permanecem escassas. **OBJETIVO:** Avaliar a frequência de rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1* em pacientes brasileiros diagnosticados com câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC) e associar o perfil molecular com os dados clinicopatológicos dos pacientes. **MATERIAL E MÉTODOS:** Em uma casuística de pacientes diagnosticados com CPNPC *EGFR/KRAS wildtype* (n=148), foi investigada a presença de rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1* por meio da tecnologia *nCounter* (NanoString Technologies) utilizando o painel customizado Elements XT. Para a confirmação dos resultados obtidos, foram realizados os testes de FISH, IHQ ou NGS em um conjunto de amostras. A ancestralidade genética dos casos de CPNPC foi investigada e as proporções de ancestralidade foram categorizadas em tercís. Para a associação da presença de rearranjos com as variáveis clinicopatológicas e sociodemográficas foram utilizados os testes qui-quadrado, exato de Fisher, regressão linear e, para as análises de sobrevida, os de testes Log-Rank e regressão de Cox. **RESULTADOS:** Das 148 amostras dos pacientes *wildtype* para mutações nos genes *EGFR/KRAS*, a média de idade foi de 60 anos, sendo a maioria dos casos homens, autodeclarados brancos, com histórico tabagista e tipo histológico adenocarcinoma. O estadiamento da doença, a presença de metástase, perda de peso, performance status e ancestralidade asiática foram associados com um melhor desfecho clínico dos pacientes. A frequência de rearranjos no gene *ALK* foi de 13% (n=14,2); *ALK* com menor idade ao diagnóstico, pacientes nunca fumantes e presença de metástase no sistema nervoso central. A frequência de rearranjos no gene *RET* foi 1,3% (n=2) e no gene *ROS1* 0,7% (n=1). A frequência dos rearranjos do gene *ALK* foi de 6% (21/348) em casuística de pacientes com dados das análises moleculares (*EGFR/KRAS/ALK/RET/ROS1*). Foi realizada IHQ para *ALK* em 7 amostras e observou concordância de 85% com o resultado encontrado pelo NanoString. Os indivíduos

apresentaram um perfil de ancestralidade predominante europeu (EUR=75,1%; ASN=6,4%; AME=5,9%; AFR=12,5%), porém, não houve associação entre presença de rearranjos em *ALK* com ancestralidade. **CONCLUSÃO:** A frequência dos rearranjos do gene *ALK* mostrou-se alta em uma casuística miscigenada e existe associação da presença de rearranjos do gene *ALK* com pacientes jovens, nunca fumantes e com metástases ao diagnóstico. Os nossos resultados contribuem para um maior conhecimento da frequência de rearranjos gênicos em pacientes brasileiros com CPNPC em um centro de referência no tratamento de câncer.

Palavras-chave: Câncer de Pulmão Não-Pequenas Células, medicina personalizada, NanoString, *ALK/RET/ROS1*, alvos terapêuticos.

ABSTRACT

NOVAES LAC. Frequency and clinical-pathological impact of oncogenic rearrangements (*ALK*, *RET* and *ROS1*) in Brazilian wildtype *EGFR* and *KRAS* patients with non-small cell lung cancer. Thesis (Master's degree). Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2019.

BACKGROUND: The development of targeted therapies for *ALK*, *RET* and *ROS1* gene rearrangements has revolutionized the treatment of lung cancer patients. Large-scale genomics studies have identified the frequency of these rearrangements in various ethnicities. However, information on the frequency of *ALK*, *RET* and *ROS1* gene rearrangements in mixed populations remains scarce. **OBJECTIVE:** To evaluate the frequency of *ALK*, *RET* and *ROS1* gene rearrangements in Brazilian patients diagnosed with NSCLC and to associate the molecular profile with the clinicopathological data of the patients. **MATERIAL AND METHODS:** In a series of patients diagnosed with NSCLC *EGFR/KRAS wildtype* (n = 148), the presence of rearrangements of the *ALK*, *RET* and *ROS1* genes by nCounter technology (NanoString Technologies) using the custom panel was investigated. Elements XT. To confirm the results obtained, FISH, IHQ or NGS tests were performed on a set of samples. The genetic ancestry of the NSCLC cases was investigated, and the ancestral proportions were categorized into tertiles. For the association of the presence of rearrangements with the clinicopathological and sociodemographic variables, the chi-square, Fisher's exact test, linear regression and the survival analyzes were performed using the Log-Rank and Cox regression tests. **RESULTS:** Of 148 In wildtype patient samples for mutations in the *EGFR/KRAS* genes, the mean age was 60 years, most of them male, self-declared white, with a smoking history and adenocarcinoma histological type. Staging of the disease, presence of metastasis, weight loss, performance status, and Asian ancestry associated with better clinical outcome of patients. The frequency of rearrangements in the *ALK* gene was 13% (n = 14.2); associate with younger at diagnosis, never smokers, and central nervous system metastasis. The frequency of rearrangements in the *RET* gene was 1.3% (n = 2) and in the *ROS1* gene 0.7% (n = 1). The frequency of *ALK* gene rearrangements was 6% (21/348) in a series of patients with molecular analysis data (*EGFR / KRAS / ALK / RET / ROS1*). IHQ was performed for *ALK* in 7 samples and observed 85% agreement with the result found by NanoString. The individuals had a predominant European ancestry profile (EUR = 75.1%; ASN = 6.4%; EBF = 5.9%; AFR = 12.5%), but there was no association between presence of *ALK* rearrangements. with ancestry. **CONCLUSION:** The

frequency of *ALK* gene rearrangements was high in a mixed sample and there is an association of *ALK* gene rearrangements with young patients, never smokers and with metastases at diagnosis. Our results contribute to a better understanding of the frequency of gene rearrangements in Brazilian NSCLC patients at a referral center for cancer treatment.

Keywords: Non-Small Cell Lung Cancer, personalized medicine, NanoString, *ALK / RET / ROS1*, therapeutic targets.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão é a principal causa de morte por câncer no mundo (1,76 milhões de mortes)¹, com uma estimativa para 2018 de 2,09 milhões de novos casos tornando-se o câncer mais incidente no mundo (**Figura 1**).

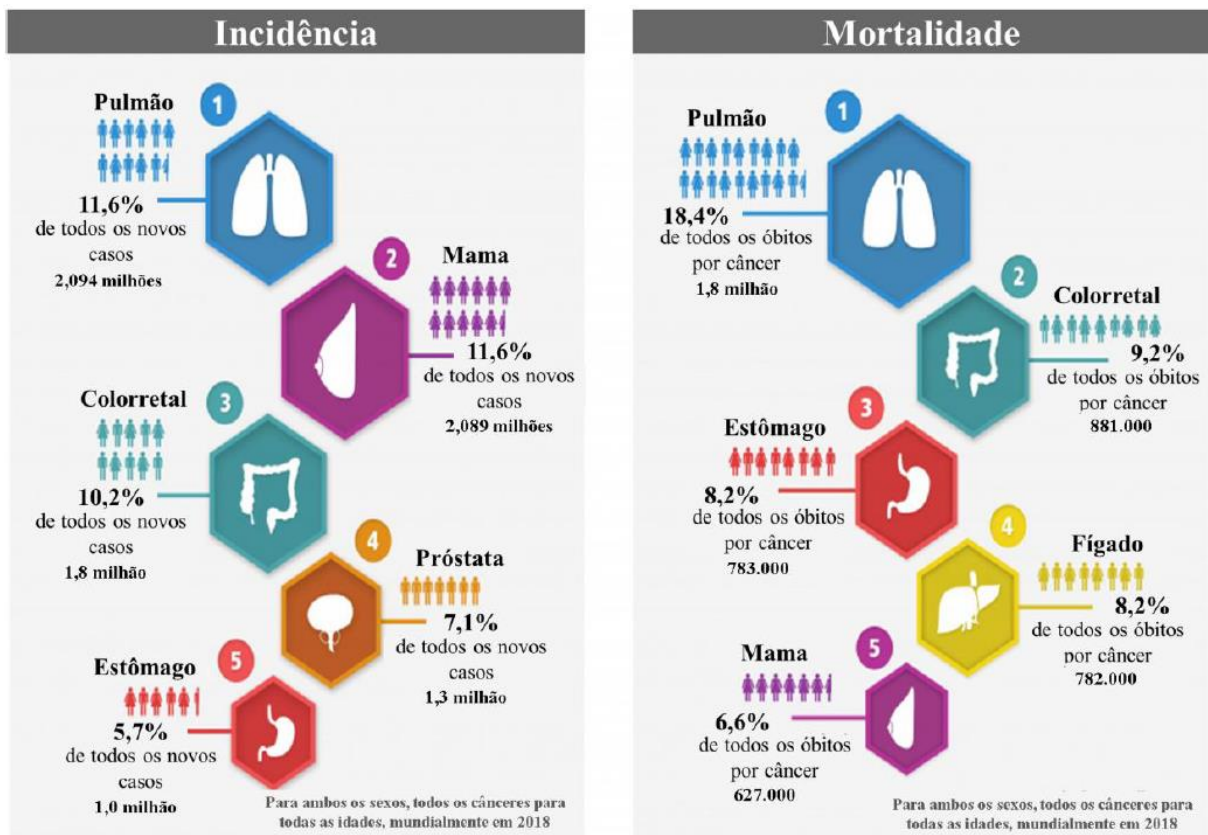
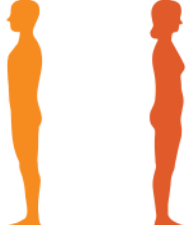


Figura 1. Número de casos e mortalidade para os cinco tipos de câncer mais incidentes e que levam a óbito globalmente¹.

Para os anos de 2018 e 2019, é estimado aproximadamente 32 mil novos casos de câncer de pulmão, entre homens e mulheres no Brasil, com estimativa de 18,16 novos casos de câncer de pulmão em 100 mil homens e 11,81 novos casos em 100 mil mulheres (**Figura 2**)².

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens 	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2. Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para 2018 por sexo. Dados INCA, 2018. *Exceto caso de pele não melanoma².

No ano de 2017, 486 novos casos de câncer de pulmão foram diagnosticados no Hospital de Câncer de Barretos (Hospital de Amor – Barretos), sendo 272 casos do sexo masculino e 216 do sexo feminino (**Figura 3**). De todos os casos diagnosticados em 2017, quase 70% dos casos foram diagnosticados em estadiamento avançado (III/IV) (**Figura 4a**); e com sobrevida em 5 anos inferior a 10% (**Figura 4b**).

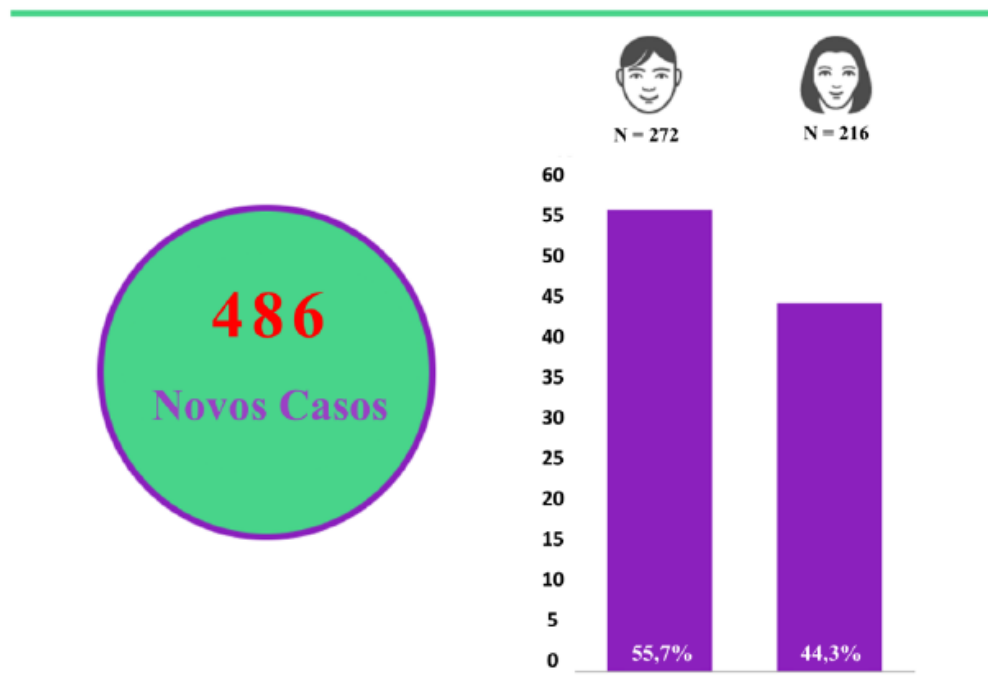


Figura 3. Infográfico do número de novos casos de câncer de pulmão em 2017, no Hospital de Câncer de Barretos. Dados gerados pelo departamento de Registro Hospitalar HCB.

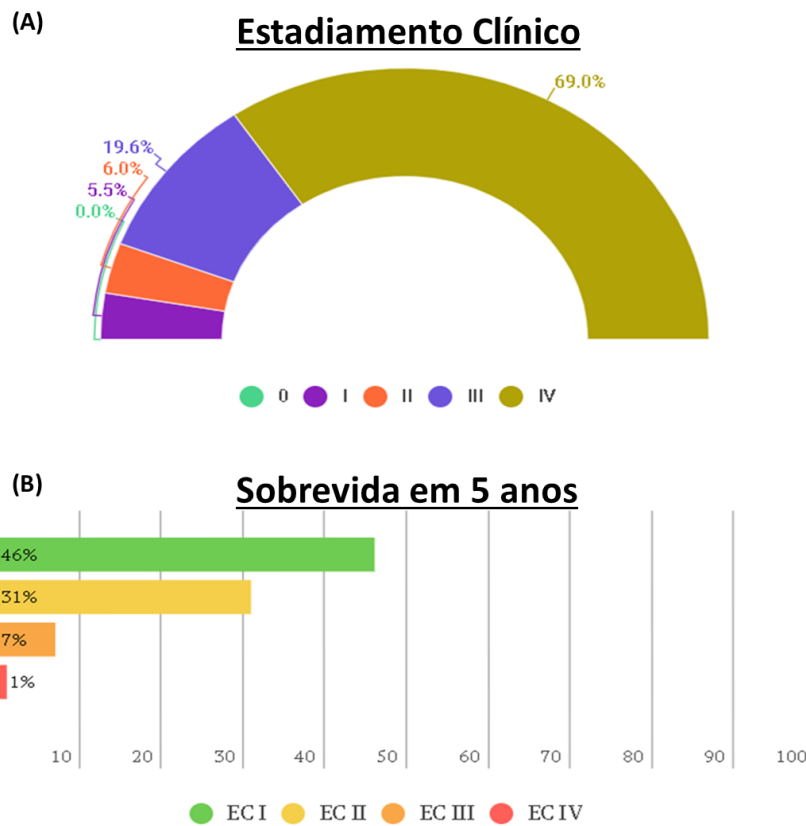


Figura 4. Gráficos representando o estadiamento clínico (A) e a sobrevida global em 5 anos (B) dos casos de câncer de pulmão admitidos no Hospital de Amor.

1.2 Fatores de risco

O principal fator de risco associado ao câncer de pulmão é o tabaco. O hábito de fumar cigarro, que contém diversas substâncias cancerígenas incluindo o tabaco, é a causa principal em aproximadamente 80% dos casos de câncer de pulmão³. Além disso, o risco do indivíduo ter câncer de pulmão aumenta em relação à quantidade de cigarros fumados ao dia e ao tempo de exposição ao longo dos anos^{2, 3}. Pessoas que convivem com tabagistas podem ter um maior risco em desenvolver a doença por estarem expostas à fumaça dos cigarros do fumantes³. Fatores ocupacionais, como a inalação de particulados (amianto), e fatores ambientais, como poluição do ar e exposição a agrotóxicos, também estão relacionados ao aumento do risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão^{3, 4}.

1.3 Diagnóstico, Estadiamento e Prognóstico do Câncer de Pulmão

O diagnóstico de câncer de pulmão pode ser realizado por meio dos exames de Raio-X de tórax, tomografia computadorizada, PET *scan*, broncoscopia e confirmação por biópsia transtorácica. O raio-X é um exame mais rápido, barato e de maior acesso pela população quando comparado a tomografia computadorizada, entretanto, a tomografia tem a vantagem de possuir uma projeção de imagens com maior quantidade de detalhes, tornando o diagnóstico mais confiável^{5, 6}. O PET *scan* é uma técnica moderna, com maior sensibilidade comparado à tomografia computadorizada, considerada uma ferramenta auxiliar no diagnóstico dos pacientes com câncer de pulmão, permitindo identificar possíveis lesões metastáticas, e monitoramento da doença. No entanto, o PET-scan é um exame de alto custo e com uma acessibilidade restrita à instituições de referência^{5, 6}. A confirmação do diagnóstico de câncer de pulmão é obtida por meio da realização de coleta do material tumoral por biópsia ou ressecção cirúrgica para análise histopatológica, podendo ou não ser realizado em conjunto com exames imunohistoquímicos para definição mais precisa da histologia.

O estadiamento da doença é realizado conforme as recomendações do AJCC (do inglês *American Joint Committee on Cancer*)⁷ e é um importante fator prognóstico para os pacientes. Os tumores são classificados em estadios 0, I, II, III e IV de acordo com as características do tumor primário (T), invasão linfonodal (N) e a presença de metástase (M)⁷. As recomendações da AJCC são constantemente reavaliadas e é importante que o estadiamento seja realizado na edição vigente da AJCC⁷.

Além do estadiamento, o *performance status* (PS ECOG) e o índice de massa corporal ao diagnóstico, bem como a perda de peso nos últimos seis meses e o sexo do paciente também são considerados fatores prognósticos^{8, 9}. Assim, um diagnóstico em estágio inicial, um bom estado clínico do paciente e ser do sexo feminino são indicativos de um melhor prognóstico^{8, 9}. Além destes fatores prognósticos, alguns biomarcadores também podem ser utilizados para a determinação do prognóstico (biomarcadores prognósticos), como as mutações do gene *KRAS*, que estão associadas a um pior prognóstico¹⁰.

1.4 Tratamento

O tratamento dos pacientes com câncer de pulmão pode ser realizado por ressecção cirúrgica, radioterapia e terapia sistêmica (quimioterapia, terapia-alvo, imunoterapia)⁴ a depender do estadiamento ao diagnóstico, tamanho da lesão e condições clínicas do paciente.

O tratamento cirúrgico ou tratamento curativo é indicado para os pacientes que são diagnosticados em estágio I ou II da doença. O tipo de cirurgia a ser realizado no paciente dependerá da localização e extensão do tumor, podendo ser uma pneumectomia (ressecção de um dos pulmões contendo a lesão), lobetomia (ressecção do lobo contendo a lesão) ou segmentectomia (ressecção do segmento com a lesão)^{4, 11, 12}. Para a realização da cirurgia é necessário uma avaliação das condições clínicas do paciente (*Performance Status* – PS ECOG) dos exames de imagens, garantindo que o paciente terá total condição para realizar o procedimento invasivo e recuperar-se da cirurgia. A cirurgia não é restrita a pacientes de estadiamento inicial, sendo indicada em casos específicos como esvaziamento linfonodal⁴.

A radioterapia é um tratamento não-cirúrgico localizado, com o objetivo de controlar o crescimento tumoral e diminuir o uso de terapias sistêmicas. A radioterapia pode ser indicada para pacientes com câncer de pulmão como terapia definitiva nos casos de doença localmente avançada, combinada ou não com quimioterapia, ou em pacientes de estadiamento inicial. Além disso, o tratamento também pode ser realizado nos pacientes direcionados a cirurgia, em momento pré ou pós cirúrgico. A radioterapia é indicada também nos pacientes paliativos, a fim de tratar lesões recorrentes e metástases^{4, 13, 14}.

A quimioterapia é um tratamento sistêmico indicado para pacientes diagnosticados em estádios III e IV, que apresentem um bom estado clínico para realização do tratamento. Nos pacientes direcionados a este tipo de tratamento, quimioterapias baseadas em platina trazem benefícios aos pacientes^{4, 13, 14}. A quimioterapia pode ser realizada como tratamento neoadjuvante (pré-operatório) ou adjuvante (pós-operatório com o intuito de maximizar os efeitos do tratamento cirúrgico)⁴. O outro tipo de tratamento sistêmico é a terapia alvo, este tipo de tratamento se baseia na utilização de drogas específicas para determinada alteração genética que pode ser encontrada no tumor do paciente com câncer de pulmão (**Tabela 1**)¹⁵. A terapia alvo é indicada aos pacientes com estadiamento avançado na intenção de tratamento

paliativo, sem a intenção curativa. Os inibidores de tirosina quinase (TKIs – *Tyrosine Kinase Inhibitors*) são fármacos utilizados como terapia alvo em pacientes com CPNPC, que tenham como alteração genética mutações no gene *EGFR*, ou no gene *BRAF* ou rearranjos do gene *ALK*, por exemplo ^{4, 15}. A imunoterapia é outro tratamento sistêmico paliativo e utiliza inibidores atuantes em *checkpoints* da resposta imunológica, podendo tratar os pacientes com CPNPC. A partir do nível de expressão do ligante do receptor PD-1 (PD-L1) é indicado o uso da imunoterapia¹⁶. Assim, no contexto de medicina personalizada, a identificação de alterações genéticas de relevância clínica em pacientes com CPNPC é importante para um melhor manejo clínico.

Tabela 1. Alterações genéticas encontradas em pacientes com CPNPC e os fármacos inibidores ¹⁵.

Gene	Alteração	Frequência pacientes com	
		CPNPC	Fármacos aprovados pela FDA
<i>EGFR</i>	Mutação	22% ^a	gefitinib, afatinib, erlotinib, osimertinib
<i>KRAS</i>	Mutação	20% ^a	-
<i>BRAF</i>	Mutação	2-4% ^b	vemurafeninb crizotinib, ceritinib, alectinib,
<i>ALK</i>	Rearranjo	2-7%	lorlatinib
<i>RET</i>	Rearranjo	1-2%	-
<i>ROS1</i>	Rearranjo	1-2%	crizotinib
<i>NTRK</i>	Rearranjo	1-2%	larotrectinib

a-população brasileira¹⁰; b-mutações *BRAF* V600E

1.5 Histologia

O câncer do pulmão é classificado, de acordo com a histologia do tumor, em dois tipos principais: câncer de pulmão de pequenas células (CPPC) e câncer de pulmão não pequenas células (CPNPC)¹⁷.

O câncer de pulmão de pequenas células, representa cerca de 10 a 15% dos casos de câncer de pulmão, está associado a uma carga tabagista elevada, comportamento bastante agressivo e os pacientes apresentam rápida evolução da doença ¹⁸⁻²⁰..

O câncer de pulmão de não pequenas células é o tipo histológico mais frequente entre os pacientes com câncer de pulmão, representando cerca de 80 a 85% dos casos, podendo ser localmente avançado ou metastático em 70-80% dos casos. O CPNPC pode ainda ser dividido em subtipos histológicos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de

grandes células casos ^{1,17}. Os adenocarcinomas representam cerca de 47% dos casos e podem ainda ser divididos em padrões histológicos (acinar, lepidico, mucinar, micropapilar, sólido e papilar). Os carcinomas de células escamosas são divididos em queratinizante, não queratinizante e basaloíde. Os carcinomas de grandes células corresponde aos tumores não classificáveis morfologicamente ou por marcação imunohistoquímica. De acordo com a última atualização da classificação histológica pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o carcinoma neuroendócrino passou em ser considerado como outro subtipo histológico de CPNPC, ^{4,21,22} (Figura 5).

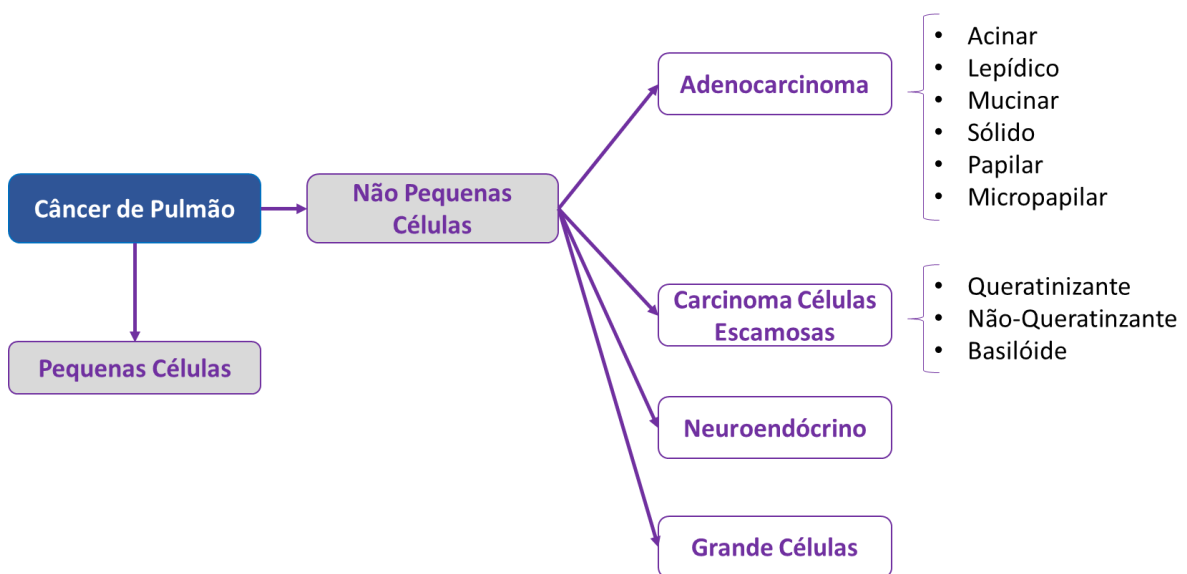


Figura 5. Classificação histológica do câncer de pulmão.

1.6 Aspectos moleculares do câncer de pulmão

O câncer de pulmão é uma patologia muito complexa com diversos fatores, tanto a nível molecular como mutações *drivers*, quanto a nível de exposição ambiental como o tabaco, contribuindo para o desenvolvimento da doença e podendo atuar sinergicamente¹⁷. Além da divisão com base na morfologia celular, o câncer de pulmão pode ser dividido também de acordo com a presença de alterações moleculares, tal como o perfil mutacional, as variantes estruturais, o perfil de expressão gênica e o perfil epigenético. O perfil mutacional varia de acordo com o tipo histológico do tumor e estágio da doença ²³. As mutações nos genes *EGFR* e *KRAS* estão entre as alterações mais frequentemente encontradas em pacientes com

adenocarcinoma de pulmão com relevância clínica²⁴. Diversas outras alterações moleculares podem ser observadas entre os casos de CPNPC, e a frequência destas alterações pode variar em diferentes estadios da doença²⁵. Um exemplo dessas diversas alterações que podem ser observadas são os rearranjos envolvendo os oncogenes *ALK*, *RET* e *ROS1*.

Diversas alterações moleculares pode ser identificadas em pacientes com CPNPC e para algumas alterações *drivers* já existem drogas, aprovadas pela FDA (do inglês “*Food and Drugs Administration*”) para uso clínico, inibindo o efeito oncogênico dessas alterações e permitindo uma redução do tamanho do tumor^{10, 25, 26} (**Figura 6**). Dessa forma, o conhecimento de alterações moleculares específicas desta patologia, pode auxiliar no direcionamento do tratamento de pacientes com CPNPC, permitindo o manejo clínico com terapias-alvo²⁷.

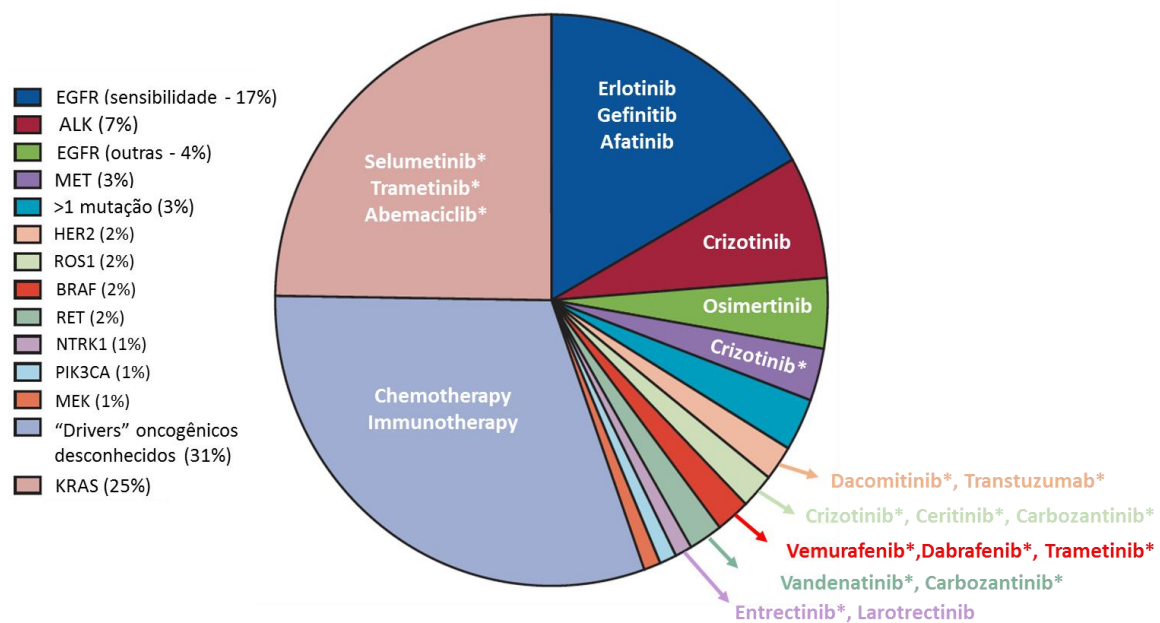


Figura 6. Representação gráfica de alterações moleculares (mutações / rearranjos) encontradas em casos CPNPC e seus respectivos fármacos inibidores. Adaptado de Hirsch et al, 2017²⁶.

1.6.1 EGFR

O gene *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) está localizado no cromossomo 7 e codifica um receptor de membrana com atividade tirosina quinase. Este gene promove a regulação da sinalização das vias direcionadas a proliferação celular, migração celular, angiogênese e escape da apoptose^{27, 28}. A partir de mutações no domínio quinase do gene *EGFR* ocorre a ativação constitutivas do receptor de membrana e estimulação das vias reguladas pelo gene, contribuindo para o desenvolvimento tumoral no pacientes com câncer de pulmão²⁸. As mutações mais frequentes do gene *EGFR* em pacientes com CPNPC, ocorrem nos exon 19 (deleções) e exon 21 (p.L858R)^{28, 29}. Os pacientes que apresentam mutações no gene *EGFR* são direcionados ao tratamento com terapia alvo, utilizando TKIs como o gefitinib, o afatinib ou o erlotinib^{4, 30}. No entanto, ao longo do uso do tratamento com os inibidores, novas mutações podem surgir e promover resistência do tumor aos medicamentos, como exemplo a mutação p.790M que está associada a resistência ao tratamento com erlotinib e gefinib²⁹.

1.6.2 KRAS

O gene *KRAS* (*Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) codifica uma proteína da superfamília de GTPases da via MAP quinase (RAF-MEK-ERK), promovendo a sinalização da via de proliferação e sobrevivência celular^{27, 31}. Mutações no gene *KRAS* são mais frequentemente no códon 12 e mais raramente nos códon 13 e 61, promovendo continuamente a proliferação celular através das vias MAP-quinase e fosfoinositida-3-quinase (PI3K)³². Até o momento, nenhuma terapia alvo foi aprovada para uso nos pacientes com mutações no gene *KRAS*, entretanto a identificação das mutações servem como biomarcadores prognóstico, em que na sua presença associa-se a um pior prognóstico dos pacientes^{10, 29, 33}. Além disso, as mutações do *KRAS* e do gene *EGFR* são mutuamente exclusivas.

1.6.3 Rearranjos Gênicos em Câncer de Pulmão Não-pequenas Células

Os rearranjos gênicos ou rearranjos podem ser originados a partir da união de fragmentos de dois genes independentes por meio de rearranjos estruturais³⁴, podendo ocorrer de diferentes formas a nível de DNA por meio de translocações, inserções, cromotripsia, duplicações, deleções (Figura 7), entre outras, bem como durante o processo de produção de RNA³⁵. Em diversos tipos de neoplasias, estas alterações possuem propriedades oncogênicas, podendo atuar como alterações “drivers” no desenvolvimento tumoral^{36,37}. O mecanismo pelo qual os genes de rearranjo exercem seu papel oncogênico, pode se dar pela desregulação de um dos genes envolvidos no rearranjo, normalmente um proto-oncogene ligado a um promotor com alta expressão gerando a formação de uma proteína alterada com ativação constitutiva de, por exemplo, uma tirosina quinase. Por esta razão, os rearranjos também podem ser importantes alvos terapêuticos.

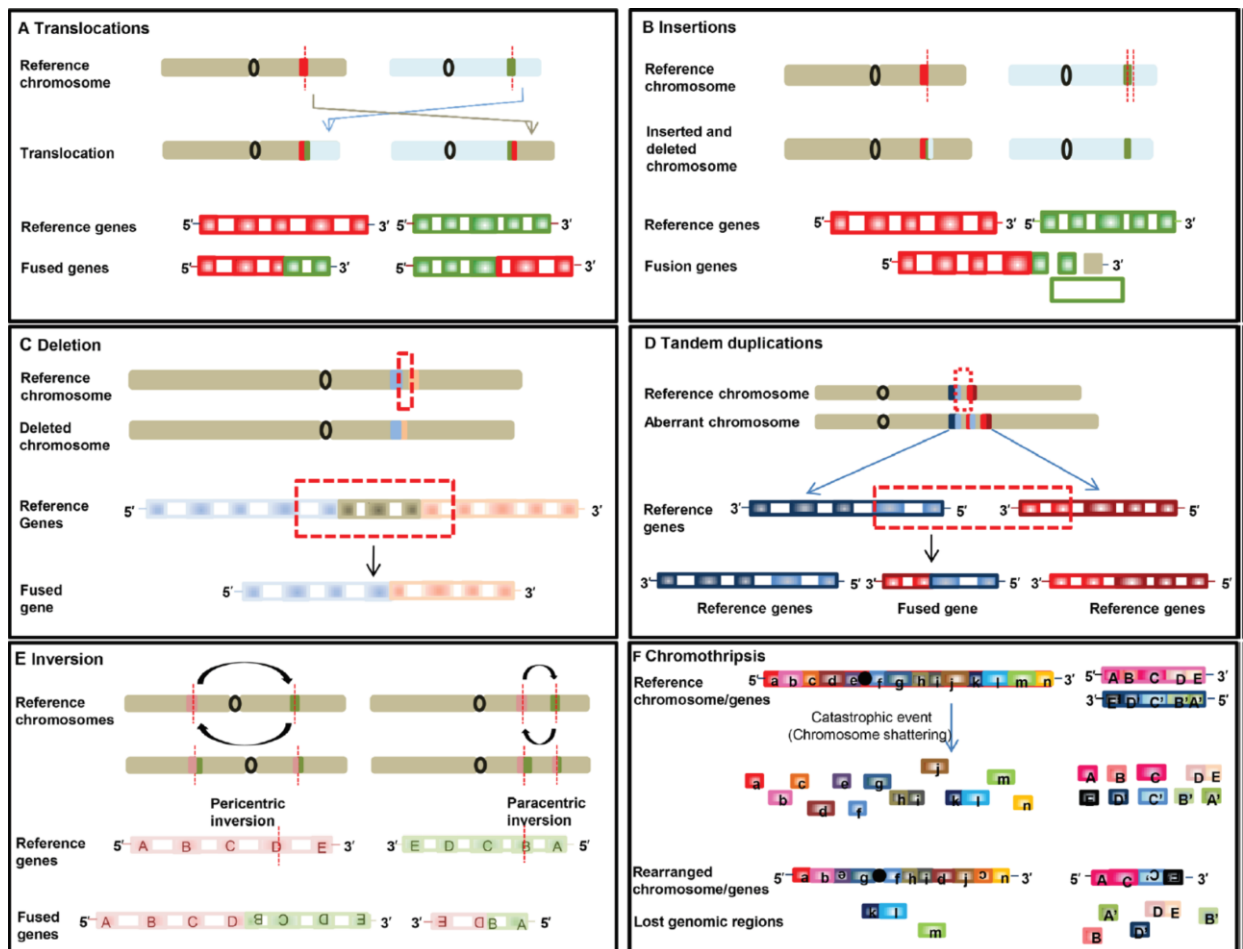


Figura 7. Representações esquemáticas da formação de rearranjos gênicos por (A) Translocação, (B) Inserções, (C) Deleções, (D) Duplicações, (E) Inversões, (F) Cromotripsia³⁵.

Em adenocarcinoma de pulmão, rearranjos em genes considerados alvos terapêuticos tais como *EML4-ALK*, *KIF5B-ALK*, *KIF5B-RET*, *CD74-ROS1* podem ocorrer em 1-6% dos casos³⁸,³⁹. Mais recentemente a identificação de rearranjos nos genes *NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3* ganharam grande importância no tratamento de tumores sólidos, incluindo CPNPC, com o fármaco larotrectinib, sendo a primeira droga agnóstica aprovada para uso clínico^{40, 41}. Por meio do conhecimento desses rearranjos gênicos, pode-se classificar de forma mais precisa os subtipos moleculares do câncer de pulmão, possibilitando a estratificação de pacientes para direcionamento do tratamento com terapias-alvo moleculares⁴²⁻⁴⁴ (**Figura 8**).

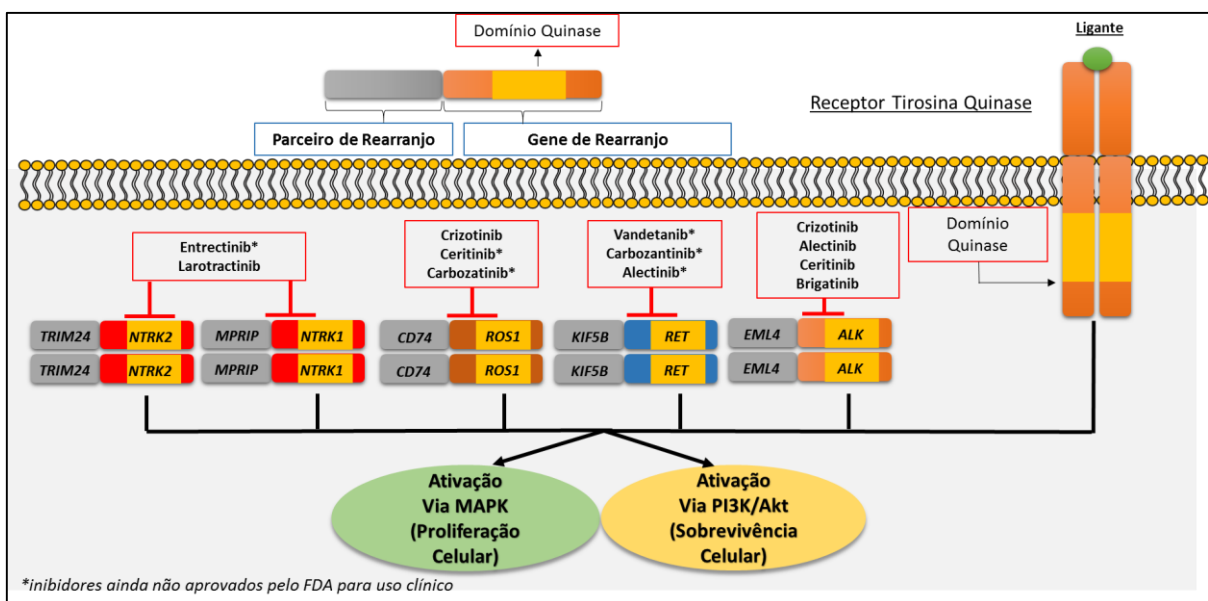


Figura 8. Representação integrada das vias de sinalização alteradas pelos rearranjos gênicos e terapias-alvo disponíveis.

1.6.4 ALK

A quinase de linfoma anaplásico (*ALK*, do inglês *Anaplastic lymphoma kinase*) é um receptor tirosina quinase. A ligação do ligante ao *ALK* ativa a via de proteína quinase desencadeando a sinalização de vias MAPK e PI3K/Akt envolvidas na proliferação, sobrevivência, angiogênese e migração das células⁴⁵ (**Figura 8**). Diversas alterações moleculares no gene *ALK* como mutações, ampliações e super expressão, estão relacionadas ao desenvolvimento de tumores⁴⁶. Rearranjos do gene *ALK* foram identificados

inicialmente em linfoma anaplásico de células grandes⁴⁷. Posteriormente, o rearranjo também foi identificado em outros tipos de câncer, inclusive tumores miofibroblásticos inflamatórios, linfoma difuso de células B, câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC) e carcinomas epidermóides do esôfago, câncer colorretal e de mama^{48, 49}. A translocação da porção 3' de *ALK*, do cromossomo 2, que contém o seu domínio catalítico quinase e uma porção 5' promotora de determinado gene, podem ativar constitutivamente as vias relacionadas a *ALK* e promover o desenvolvimento de tumores⁵⁰. O potencial oncogênico de *ALK* pode aumentar por meio desses novos rearranjos (**Tabela 2**), observado em CPNPC, pela presença de *NPM1-ALK* e *EML4-ALK*, com uma frequência dos rearranjos em pacientes com este subtipo do câncer de pulmão de 5-6%^{51, 52}.

Usualmente, a presença da translocação *ALK-EML4* é considerada mutuamente exclusiva com a presença de mutações nos genes *EGFR* e *KRAS*, entretanto, em alguns estudos foi identificada a presença de rearranjos de *ALK* juntamente com mutações de *EGFR* ou *KRAS*^{53, 54}. O crizotinib, um potente inibidor de tirosina quinase, é capaz de diminuir a atividade tumoral em células que apresentam rearranjos de *ALK*, prolongando a sobrevida global e a sobrevida livre de progressão da doença em pacientes CPNPC com os rearranjos⁵⁵. Embora grande maioria dos pacientes CPNPC com rearranjos *ALK* tenham benefícios com o uso do crizotinib, alguns pacientes podem desenvolver resistência à terapia, devido a mutações e ganho do número de cópias do gene⁵⁶. O ceritinib e o alectinib são inibidores de segunda geração e inibem seletivamente rearranjos *ALK* e com mutações de resistência ao crizotinib, com grande aumento da sobrevida global dos pacientes CPNPC tratados⁵⁶⁻⁵⁸. Portanto, a detecção dos rearranjos de *ALK* faz-se importante para predizer uma resposta clínica favorável a terapia-alvo adequada quando alterações dos genes *EGFR* e *KRAS* estão ausentes⁵⁹.

1.6.5 RET

O *RET* proto-oncogene codifica um receptor tirosina quinase que se localiza no cromossomo 10q11.2 e a proteína codificada por este gene apresenta um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um domínio tirosina quinase intracelular, o qual é ativado a partir de um complexo multimérico, sinaliza a proliferação, migração e diferenciação celular^{60, 61}(**Figura 8**).

Rearranjos cromossômicos ocasionados a partir de rearranjos entre a extremidade 3' (domínio tirosina quinase) de *RET* e a extremidade 5' de outro gene separado, foram inicialmente relatados em 1990, no câncer de tireoide papilar⁶². Em seguida, a presença de rearranjos do gene *RET* foi identificada em casos de carcinossarcoma pulmonar, carcinoma epitelial ovariano, adenocarcinoma de glândula salivar, carcinoma ductal pancreático e em alguns casos de carcinomas colorretais e de mama⁶³. Tais rearranjos envolvendo o gene *RET* também foram identificados em aproximadamente 1-2% dos casos de CPNPC⁶⁴. Em um estudo analisando amostras de adenocarcinoma pulmonar de pacientes não-fumante por meio de sequenciamento do transcriptoma das células tumorais identificou-se um novo gene de rearranjo integrando a porção 5' de *KIF5B* e a porção 3' de *RET*⁶⁵. *KIF5B*, *CCDC6*, *NCOA4* e *TRIM33* já foram identificados em rearranjos com *RET* em CPNPC, dos quais, excluindo *TRIM33*, todos se localizam no cromossomo 10 e *KIF5B* é o parceiro mais comum⁶⁶⁻⁶⁸ (**Tabela 2**). Os rearranjos envolvendo *RET* são mutuamente exclusivos com mutações em *EGFR*, *KRAS*, *ALK*^{66, 69}.

Os rearranjos de *RET* têm sido apontados como possíveis alvos terapêuticos em CPNPC e em estudos clínicos realizados com o uso dos TKIs cabozantinib, vandetanib e lenvatinib para o tratamento de pacientes com rearranjos *RET*, apresentaram respostas parciais aos medicamentos e houve variação da resposta de acordo com o parceiro de rearranjo entre os pacientes⁷⁰. Mais recentemente estudos clínicos com o composto *LOXO-292*, o inibidor altamente seletivo para rearranjos do gene *RET*, vêm mostrando avanços no tratamentos de pacientes com câncer de pulmão, podendo ser em breve aprovado para uso clínico^{71, 72}.

1.6.6 *ROS1*

O *c-ros oncogene 1 (ROS1)*, localizado no cromossomo 6, codifica um receptor de tirosina quinase e consiste de domínios extracelular, transmembrana e tirosina quinase intracelular⁷³. Primeiramente identificados em linhagem celular de glioblastoma, os rearranjos de *ROS1* foram descritos em outros tipos tumorais, como colangiocarcinoma, câncer de ovário, adenocarcinoma gástrico e em de câncer colorretal⁷³⁻⁷⁵, sendo seu potencial oncogênico mais profundamente estudado em CPNPC^{73, 76}. Os rearranjos *ROS1* foram relatados em CPNPC em cerca de 2,4% dos adenocarcinomas de pulmão, das quais *CD74-ROS1* é a mais comum⁷⁷ (**Tabela 2**). Os rearranjos no gene *ROS1* englobam pontos de ruptura

conservados preservando o domínio da tirosina quinase⁶⁹. Rearranjos do gene *ROS1* promovem o aumento da sinalização das vias intracelulares ERK, PI3K/mTOR e JAK-STAT promovendo a sobrevivência e a proliferação celular e aumento do poder de invasão celular ⁷³(**Figura 8**). Estudos clínicos demonstraram que o uso de crizotinib no tratamento pacientes com rearranjos de *ROS1*, apresentou alta taxa de resposta objetiva ao tratamento e aumento da sobrevida dos pacientes tratados ^{76, 78}. Além disso, o fármaco apresentou baixa toxicidade, sendo que efeitos adversos foram raros e, quando presentes, eram semelhantes aos que ocorrem em pacientes com rearranjos do gene *ALK* ^{76, 79}.

Tabela 2. Lista dos parceiros conhecidos de rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1* em CPNPC.

Gene	Parceiros	Gene	Parceiros	Gene	Parceiros
					<i>CD74-ROS1</i>
					<i>EZR-ROS1</i>
					<i>TPM3-ROS1</i>
	<i>EML4-ALK</i>		<i>KIF5B-RET</i>		<i>SLC34A2-ROS1</i>
	<i>KI5B-ALK</i>		<i>CCD6-RET</i>		<i>SDC4-ROS1</i>
	<i>TGF-ALK</i>		<i>NCOA-RET</i>		<i>LRIG3-ROS1</i>
<i>ALK</i>	<i>HIP1-ALK</i>	<i>RET</i>	<i>TRIM33-RET</i>	<i>ROS1</i>	<i>CCDC6-ROS1</i>
	<i>TPR-ALK</i>		<i>CUX-RET</i>		<i>CLTC-ROS1</i>
	<i>KLC1-ALK</i>		<i>KIAA1468-RET</i>		<i>FIG-ROS1</i>
	<i>NPM1-ALK</i>				<i>GOPC-ROS1</i>

1.7 Ancestralidade

A frequência de alterações moleculares *drivers* pode variar entre as etnias e pode ser influenciada pelas proporções de ancestralidade dos indivíduos ^{80, 81}(**Figura 9**). Diferentes tipos de câncer estão relacionados a diferentes etnias, assim a frequência de alterações oncogênicas em cada tipo de câncer também pode diferir entre as populações⁸⁰. Em pacientes com câncer de pulmão é observado que, de acordo com a origem geográfica da população, os biomarcadores moleculares apresentam frequências distintas entre as populações⁸¹. As mutações no gene *EGFR* são mais frequentes em pacientes de etnia asiática, chegando a 50% dos casos, enquanto que pacientes com etnias não asiáticas apresentam uma maior probabilidade em apresentarem mutações do gene *KRAS* ^{10, 82}. Para rearranjos do gene *ALK*,

também é observado diferenças sobre a frequência dos rearranjos entre indivíduos asiáticos em relação a indivíduos europeus e norte-americanos⁸¹.

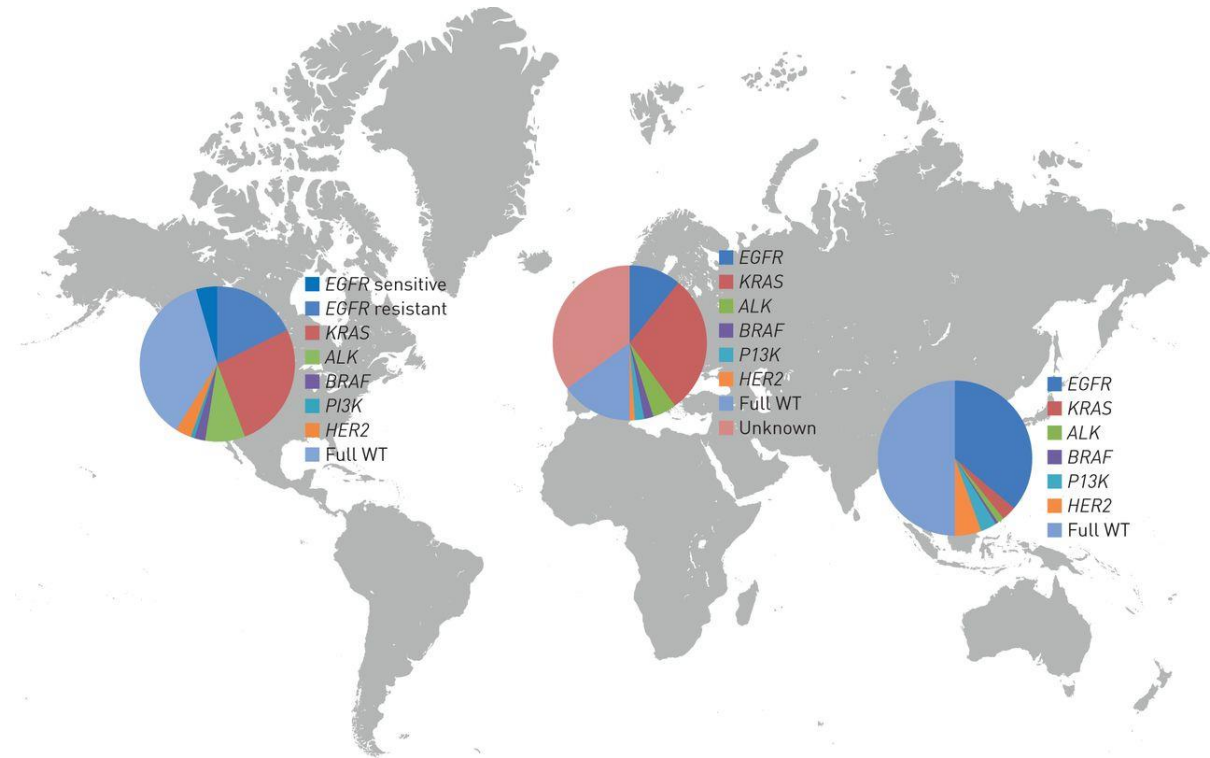


Figura 9. Epidemiologia molecular do câncer de pulmão de células não pequenas na América do Norte, Europa e Ásia ⁸¹.

1.8 Métodos de Detecção de Rearranjos Gênicos

Para a detecção dos rearranjos *ALK*, *RET*, e *ROS1*, podem ser utilizados atualmente diversos métodos como a RT-qPCR (do inglês *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*), imunohistoquímica, hibridização *in situ* e NGS (do inglês *Next Generation Sequencing*), todos apresentando vantagens e desvantagens em suas aplicações ³⁸.

1.8.1 Imunohistoquímica (IHQ)

O uso da técnica de IHQ para a identificação das rearranjos do gene *ALK* em pacientes com CPNPC é aprovado pela FDA, sendo a técnica considerada um teste aceitável no diagnóstico dos rearranjos, quando o resultado é claramente positivo ⁸³. A identificação é realizada por meio da marcação da proteína resultante do rearranjo gênico por meio de um

anticorpo marcado com enzima peroxidase. Na presença do rearranjo a interação antígeno-anticorpo ocorre e a partir da adição de substrato, torna-se possível a visualização da presença da proteína oncogênica. No entanto, a técnica de IHQ é bastante dispendiosa de tempo, mão-de-obra, sem capacidade de análise de alvos simultâneos, assim sendo necessário uma quantidade maior de tecido tumoral necessário para investigação de múltiplos rearranjos gênicos³⁸.

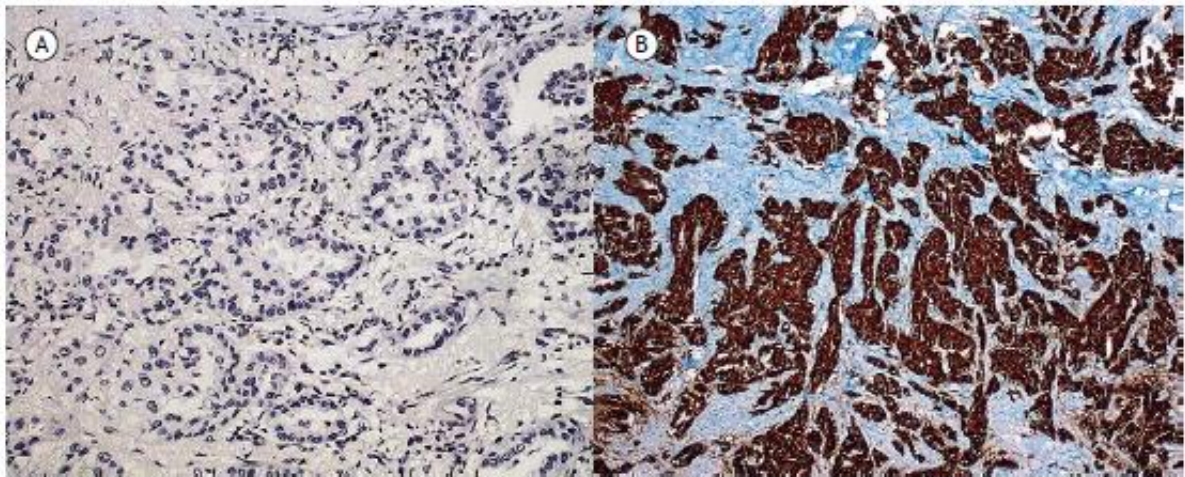


Figura 10. Expressão de *ALK* em CPNPC. (A) Adenocarcinoma pulmonar de padrão acinar negativo para expressão de rearranjo do gene *ALK*. (B) Adenocarcinoma pulmonar de padrão acinar positivo para expressão de rearranjo do gene *ALK*. Adaptado de Oliveria et al, 2019⁸⁴.

1.8.2 Fluorescence in situ hybridization (FISH)

A técnica de FISH é considerada o principal método para a detecção dos rearranjos do gene *ALK* em pacientes com CPNPC, após a aprovação do crizotinib pela FDA para o tratamento dos pacientes portadores desses rearranjos⁸⁵. A técnica se baseia, na identificação dos rearranjos por meio de sondas *break-apart* marcadas, específicas nas regiões 3' e 5' do DNA ao ponto de quebra de cada rearranjo gênico. Na presença de rearranjo gênico no tecido tumoral, é observado um distanciamento entre as duas sondas, ocasionado pela reorganização da sequência do DNA, promovendo a fusão da região 3' do oncogene com a região 5' de outro gene. No entanto, a metodologia também é dispendiosa, laboriosa, semelhante a IHQ e necessita de um patologista/analista experiente, não permitindo análises de múltiplos alvos. Além disso, a demanda de amostra usada para a realização dessas técnicas pode não ser compatível com o material disponível do paciente, uma vez que o material é

obtido por meio de biópsia na maioria dos casos e dificulta uma análise múltipla no caso da necessidade da investigação de diversos alvos em uma única amostra⁸⁶⁻⁸⁸.

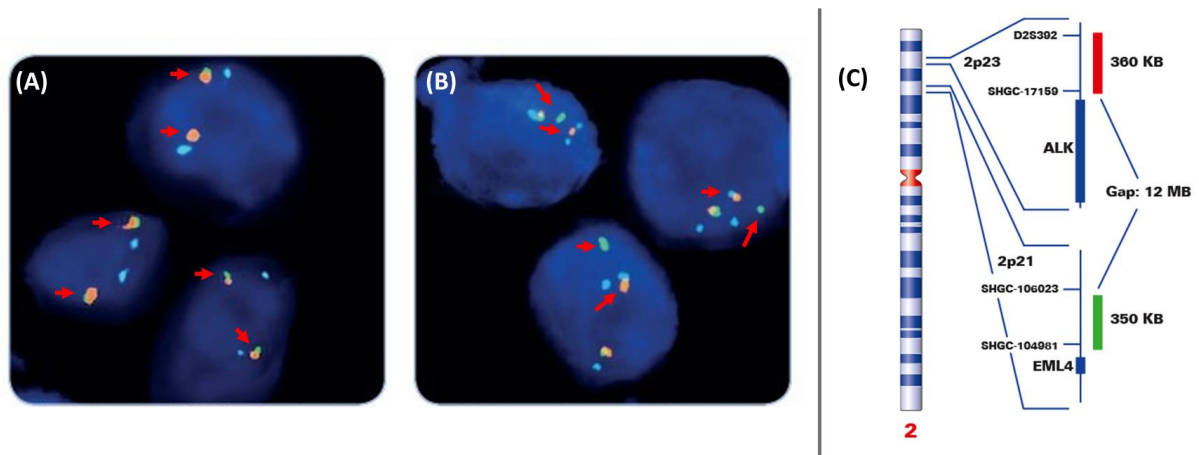


Figura 11. Representação da identificação da presença rearranjos do gene *ALK* nas células tumorais. (A) Ausência de rearranjos, sondas break-apart bem próximas entre si. (B) Presença de rearranjos, com espaçamento entre as sondas break-apart. (C) Esquemas das sonda.

1.8.3 qPCR (*Real-time Polymerase Chain Reaction*)

A técnica de qPCR em tempo real, é outra metodologia capaz de identificar os rearranjos gênicos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1* em pacientes com câncer de pulmão. A partir do desenho de *primers* (iniciadores) ou sondas específicos para uma sequência da reação 3' comum entre os rearranjos ou ao o ponto de quebra do rearranjo conhecido, é possível identificar a presença dos rearranjos^{89, 90}. A técnica de qPCR apresenta maior sensibilidade e rapidez na detecção dos rearranjos quando comparada as técnicas de IHQ e FISH⁸⁹. No entanto, a qualidade do material utilizado é um fator crítico para um bom desempenho da técnica de detecção. Além disso, a qPCR consegue identificar apenas os rearranjos conhecidos, devido a especificidade dos *primers* do ensaio⁸⁹⁻⁹¹.

1.8.4 Next Generation Sequencing (*NGS*)

O uso de técnicas de análise em larga escala como a metodologia de NGS mostram um enorme potencial como métodos diagnósticos para detecção de diversas alterações genômicas. A técnica de NGS apresenta alta sensibilidade e especificidade analítica superior aos métodos tradicionais mencionados (FISH e IHQ), inclusive com a capacidade de realizar

análises multiplexadas com uma quantidade mínima de amostra ⁸⁸. A partir das análises em larga escala do genoma completo de pacientes com câncer que foi possível a identificação dos rearranjos gênicos investigados em diversos tipos de tumores, como é o caso dos rearranjos *ALK*, *RET* e *ROS1* em pacientes com CPNPC^{88, 92, 93}.

Entretanto, existem também algumas desvantagens em sua aplicação, como por exemplo o fato de ser uma técnica é laboriosa, de alto custo, com a necessidade de técnicos com grande *expertise*, bem como profissional treinado para análise dos dados gerados, ^{94, 95, 88}.

1.8.5 Tecnologia *nCounter*[®] (plataforma NanoString)

A tecnologia *nCounter*[®] (NanoString Technologies) permite a quantificação de alvos específicos em uma única amostra por meio de uma dupla hibridização de sondas de captura biotiniladas e sondas repórteres ligadas a códigos de barras fluorescentes (*color-code*) a sequências-alvo específicas. Tais códigos de cores são identificados digitalmente e contados, sendo o número de códigos de cada alvo-específico diretamente proporcional ao número de moléculas presentes em cada amostra (**Figura 12**). De acordo com o painel escolhido, pode-se avaliar a expressão de dezenas e até centenas de genes de interesse bem como variações no número de cópias ou rearranjos, rearranjos e rearranjos gênicos pela tecnologia *nCounter*[®] ^{96, 97}. Esta técnica é capaz de detectar fragmentos pequenos provenientes de amostras com alto grau de degradação (amostras derivadas de tecido parafinado, por exemplo)³⁸. Além disso, a plataforma NanoString mostra eficaz em amostras de biópsia líquida, incluindo em amostras citológicas de carcinoma pulmonar⁹⁸.

Tabela 3. Comparação entre os métodos FISH, IHC, qRT-PCR, NGS e NanoString usados na identificação de rearranjos.

Parâmetros		FISH	IHC	qRT-PCR	NGS	NanoString
Custo	Reagentes	*/**	***	**/**	*	**/**
	Hardware e Software	**	***	**	*	*
Aspectos técnicos	Input de RNA	NA	NA	*	***	**
	Amostras de baixa qualidade (FFPE)	*/**	**/**	*	*/**	**/**
	Tempo de bancada	*/**	*/**	**	*/**	***
	Tempo da técnica e análise dos resultados	**	**	**	*	**/**
	Interpretação dos resultados	*/**	*/**	**	***	**
	<i>Throughput</i>	*	*/**	**	***	**/**
Desempenho	Acurácia em baixa concentração	NA	NA	**	*/**	***
	Resultados quantitativos	*/**	*/**	**	***	***
	Detecção de variantes	*	*	**	***	**/**

*baixo; **intermediário; ***alto; NA-não aplicável (adaptado Evangelista et al, 2017³⁸).

2 JUSTIFICATIVA

A identificação de biomarcadores em amostras tumorais de pacientes com câncer de pulmão não pequenas células, permite, atualmente, um tratamento mais eficaz com a utilização de terapias-alvo. De acordo com as diretrizes da ASCO para indicação do tratamento com inibidores de tirosina quinase, devem ser realizadas análises moleculares para investigação de mutações dos genes *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, e também a pesquisa de rearranjos dos genes *ALK* e *ROS1*.

Estudos realizados em outros países identificaram a frequência dos rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1* em pacientes com câncer de pulmão não pequenas células. Entretanto, os dados sobre frequência dos rearranjos do gene *ALK* são escassos e dos rearranjos dos genes *RET* e *ROS1* são ausentes na população brasileira. Além disso, a frequência destes rearranjos pode ser diferente em um país miscigenado, sendo que a etnia da população avaliada tende a influenciar na frequência das alterações moleculares presente nos pacientes com câncer de pulmão.

A presença dos rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1* já foi descrita associada a pacientes jovens e não fumantes em outras populações, no entanto, não é descrito se o impacto clinicopatológico em uma casuística brasileira está em conformidade com o observado na literatura. Dessa forma, o conhecimento da frequência dos rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1*, bem como o impacto clinicopatológicos dessas alterações em pacientes brasileiros com câncer de pulmão se faz importante, podendo assim auxiliar no manejo clínico dos pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a frequência e impacto clinicopatológico dos rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1* em pacientes brasileiros *wildtype* para os genes *EGFR* e *KRAS* com câncer de pulmão não-pequenas células.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência de rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1*.
- Correlacionar a presença dos rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1* com variáveis sociodemográficas, clinicopatológicas, desfecho da doença e ancestralidade dos pacientes.
- Confirmar os resultados de rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1* por métodos utilizados atualmente na rotina diagnóstica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística e Coleta de Dados

Este é um estudo observacional retrospectivo, aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa (CEP) do HCB (Projetos nº. 630/2012 e 1139/2016) e desenvolvido no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos, Fundação Pio XII. O número amostral para o estudo foi designado por conveniência. A casuística do estudo é composta por 496 pacientes com câncer de pulmão não pequenas células diagnosticados no Hospital de Câncer de Barretos. Foram considerados como critérios de inclusão para pesquisa de rearranjos *ALK/RET/ROS1*, pacientes CPNPC com indicação para análise molecular com finalidade de manejo clínico, sem mutações nos genes *EGFR/ KRAS*¹⁰ e disponibilidade de material biológico (tecido parafinado) no setor de patologia do Hospital. Os dados clinicopatológicos e sociodemográficos dos pacientes foram previamente coletados e armazenados em banco de dados online RedCap⁹⁹ (**Anexo I**) e todos os dados de seguimento foram atualizados para as análises estatísticas.

4.2 Processamento das amostras – Extração de RNA

Foi realizada a extração de RNA a partir de amostras dos tumores em blocos de parafina (FFPE), seccionadas em 5 cortes com espessura de 10µM fixadas em lâminas. Uma das lâminas foi corada com hematoxilina e eosina (H&E) e avaliada por patologista experiente para identificação e seleção da área de tecido tumoral. O RNA foi extraído com kit comercial (RNeasy FFPE Mini Kit, Qiagen) conforme as instruções do fabricante. Inicialmente foi realizado a raspagem da área tumoral em tubos *ependorfs* e desparafinização do tecido com a utilização de solução desparafinizante comercial. Após essa etapa foi realizada a lise do tecido com a adição *buffers* e proteinase K, seguida da incubação em termobloco por 30 min (15min-56°/15min-86°). Na próxima etapa foi realizado a lavagem e purificação do RNA presente no lisado do tubo, por meio do uso de colunas de sílica do kit comercial. Ao final do processo foi realizado a eluição do RNA isolado e quantificação da amostra por espectrofotometria (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), armazenada em freezer a -80° até o momento das análises.

4.3 Análise Molecular – Detecção de rearranjos nos genes *ALK*, *RET* e *ROS1*

O painel utilizado para a análise das amostras do presente estudo é o *nCounter*[®] Elements XT (NanoString Technologies, Seattle, WA, EUA). O *nCounter*[®] Elements XT é um painel customizado designado para a avaliação de transcritos utilizando sondas específicas (<https://www.nanostring.com/products/custom-solutions/custom-codesets>), a partir de 100 ng de RNA total ⁹⁷. O painel contempla 60 sondas, representando as regiões 5' e 3' dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1*, e os parceiros de rearranjo destes genes (**Tabela 4**). As amostras de RNA foram hibridizadas com sondas específicas aos transcritos dos rearranjos por 21 horas a 67°C. A seguir, as amostras hibridizadas foram processadas pela PrepStation (NanoString Technologies), para lavagem das sondas não hibridizadas e fixação no cartucho de leitura. Em seguida, o cartucho contendo as amostras ligadas às sondas é escaneado pelo Digital Analyzer (NanoString Technologies) para contagem dos transcritos (**Figura 13**). Durante os experimentos, foram usados como controles as linhagens celulares de adenocarcinoma pulmonar H2228¹⁰⁰ (positiva para translocação de *ALK*) e Calu3¹⁰¹ (negativa para translocação de *ALK*) e controle comercial Horizon, positivo para os 3 rearranjos de *ALK*, *RET* e *ROS1* (Horizon Discovery, Cat. No.: HD784).

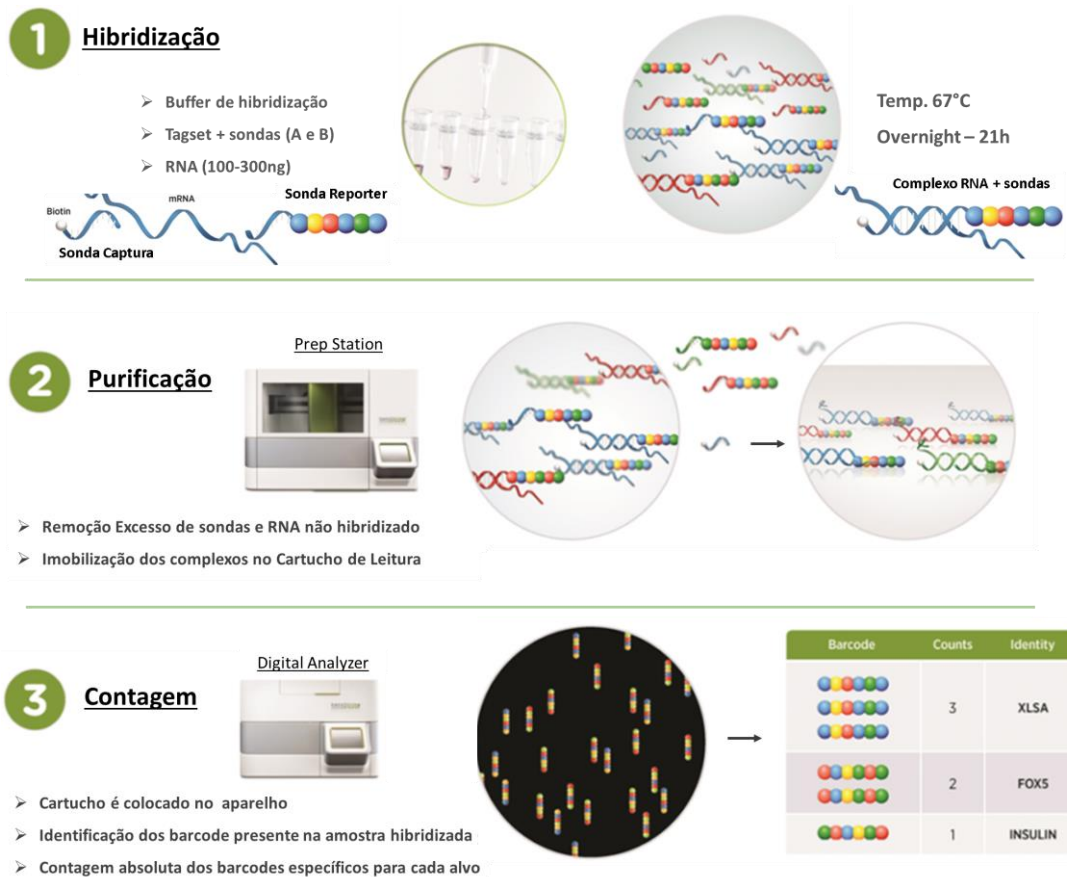


Figura 13. Fluxo de trabalho resumido da metodologia NanoString.

Tabela 4. Painel *ALK/RET/ROS1*.

Painel Elements XT <i>ALK/RET/ROS1</i>			
Sondas de Desbalanço	<i>ALK</i>	<i>RET</i>	<i>ROS1</i>
Sondas região 5'	4	4	4
Sondas região 3'	4	4	4
Parceiros de Rearranjo	<i>EML4-ALK</i> ¹	<i>CCDC6-RET</i>	<i>CD74-ROS1</i>
	<i>KIF5B-ALK</i> ²	<i>KIF5B-RET</i> ³	<i>EZR-ROS1</i>
	<i>TGF-ALK</i>		<i>GOPC-ROS1</i> ⁴
	<i>HIP1-AL</i>		<i>LRIG3-ROS1</i>
	<i>TPR-ALK</i>		<i>SLC34A2-ROS1</i> ⁴
			<i>TPM3-ROS1</i>
		<i>SDC4-ROS1</i> ⁴	
Genes Endógenos	<i>GAPDH GUSB OAZ1 POLR2A</i>		

¹ Inclui 6 variantes de rearranjo. ² Inclui 4 variantes de rearranjo. ³ Inclui 3 variantes de rearranjo. ⁴ Inclui 2 variantes de rearranjo.

4.4 Confirmação dos rearranjos pelos métodos de IHQ, FISH e NGS

4.4.1 Imunohistoquímica (IHQ)

A expressão da proteína *ALK* foi avaliada em um *subset* de amostras (n= 7). A análise foi realizada por método imunohistoquímico utilizando cortes de 5µm de tecido parafinado provenientes de pacientes CPNPC. As reações imunohistoquímicas foram realizadas em plataforma automatizada Ventana Benchmark XT utilizando o kit *Ventana ALK (D5F3) CDx assay* (#790-4796, Ventana, Tucson, AZ, EUA), conforme recomendado pelo protocolo do fabricante utilizando anticorpo primário anti-*ALK* (clone D5F3, Ventana). Para revelação e amplificação de cor foram utilizados os kits *OptiView DAB IHC Detection Kit* e *OptiView Amplification Kit* (Ventana) seguindo as instruções do fabricante. Células ganglionares no tecido adjacente serão utilizadas como controles positivos. Cortes sem incubação com anticorpo primário foram considerados controles negativos. A marcação para *ALK* foi considerada positiva se, pelo menos, uma célula apresentar coloração citoplasmática forte³⁸.

4.4.2 Hibridização fluorescente in situ (FISH)

Após a detecção da presença de rearranjos/rearranjos dos genes *RET* e *ROS1* pela tecnologia *nCounter*® os resultados foram validados pela técnica de FISH. A pesquisa envolvendo os genes *RET* e *ROS1* foi realizada como previamente descrito³⁸, utilizando sondas comerciais (ZytoLight SPEC *RET* Dual Color Break Apart e ZytoLight SPEC *ROS1* Dual Color Break Apart). Como controles positivos, foram utilizados tecidos de adenocarcinoma de pulmão e, como controle negativo, utilizado tecido de adenocarcinoma de mama. Em cada amostra, foram analisados 100 núcleos tumorais por corte e em um escore $\geq 15\%$ foi considerado para determinar a presença de rearranjo no gene de interesse⁹⁶. Para a análise dos resultados de FISH, foi utilizado o software *FISHView 6.0* (Applied Spectral Imaging).

4.4.3 Next Sequencing Generation (NGS)

Para validação dos rearranjos por NGS, foi utilizado o painel comercial Archer® FusionPlex® Lung, nas amostras com resultado inconclusivo por FISH. Este painel comercial

avalia simultaneamente importantes fusões *ALK*, *BRAF*, *FGFR*, *NRG1*, *NTRK*, *RET* e *ROS1* e selecionar mutações pontuais em 14 alvos genéticos chave associados ao câncer de pulmão. O protocolo para realização do sequenciamento e identificação dos rearranjos foi realizado conforme instruções do fabricante, sumarizado na figura 14. A partir de 250 ng de RNA, foi realizado uma primeira PCR para conversão do RNA em cDNA, e em seguida realizado o controle de qualidade da amostra com o uso do kit Archer® PreSeq™ RNA QC para aprovação das amostras para seguimento do protocolo. Após esta etapa, as amostras que tiveram RNA de boa qualidade e integridade passaram por uma nova PCR, para amplificação de cDNA. Em seguida foi realizado a construção da biblioteca por amplicon. Após o preparo da biblioteca, quantificou-se a biblioteca e o sequenciamento foi realizado por plataforma MiSeq Illumina®. A análise de dados foi feita pelo software Archer Analysis®.

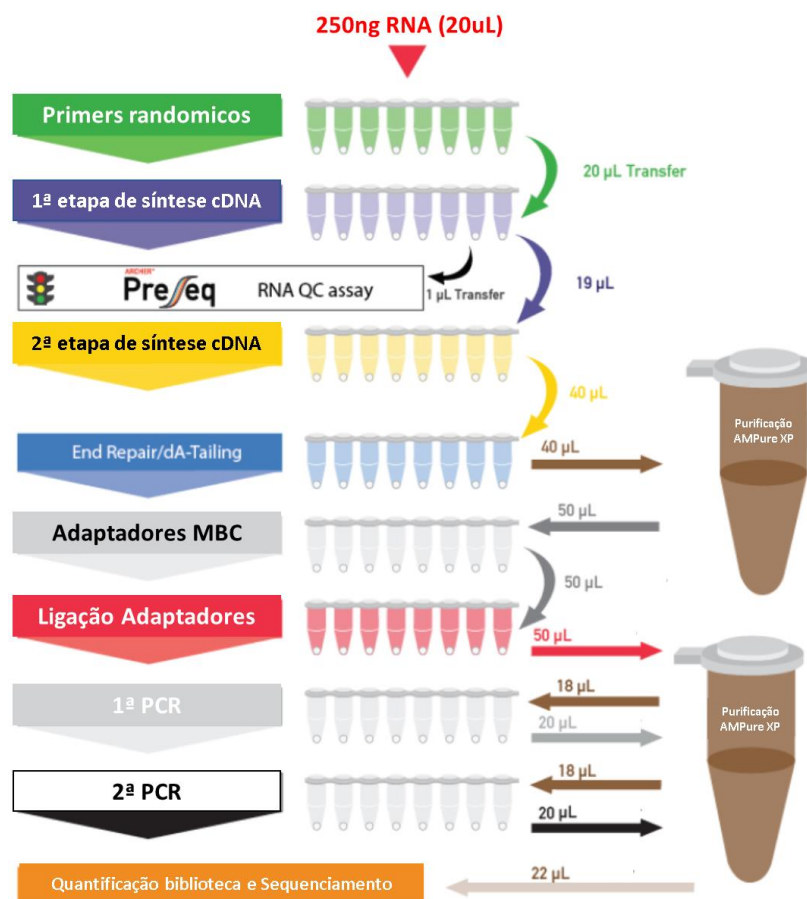


Figura 14. Fluxo de trabalho do protocolo de sequenciamento do kit comercial Archer® FusionPlex® Lung.

4.5 Análise de Ancestralidade

O perfil de ancestralidade foi previamente realizado pelo Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular¹⁰. Brevemente, a partir do DNA extraído do tecido tumoral utilizando o Kit *Mini QIAmp DNA Blood* (QIAGEN, Hilden, Alemanha), a avaliação de 46 marcadores informativos de ancestralidade foi realizada por PCR *multiplex* e análise de fragmentos, conforme descrito previamente^{102, 10}. A sequência dos oligonucleotídeos e as condições da PCR foram descritas previamente^{102, 103}. A análise foi realizada utilizando o *software Structure v2.3.3*, considerando os quatro maiores grupos populacionais (Nativo-americano, Europeu, Africano e Leste Asiático) como principais grupos étnicos da população brasileira. Os dados do *Human Genome Diversity Cell Line Panel* (HGDP-CEPH) foram utilizados como referência para as populações ancestrais e estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

4.6 Análise dos dados

As contagens dos transcritos detectadas pela plataforma NanoString foram captadas e normalizadas pelo programa *nSolver Analysis[®] Software v4.0* (NanoString Technologies), utilizando média geométrica dos controles positivos do ensaio e dos genes referência (*housekeeping*)⁹⁶. O cálculo da razão 3'/5' para os rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1*, foi realizado a partir da divisão da média geométrica da contagens da sondas da região 3' pela média das contagens da região 5' ou média dos controles negativos (background threshold – B) conforme relatado por Lira e colaboradores^{96, 104} foi realizado na plataforma Galaxy em ambiente R, juntamente com a construção dos gráficos.

As análises estatísticas foram realizadas no *software IBM SPSS[®] Statistics Base* (IBM, Armonk, NY). O limite de significância adotado para todas as análises foi de 95%. Para as análises de associação entre a presença das alterações moleculares e as variáveis clinicopatológicas serão utilizados os testes χ^2 e exato de Fisher. Para análises de sobrevivência dos pacientes foram construídas curvas de Kaplan-Meier e, para associação com a presença de rearranjos, foram realizados os testes de Log-Rank e análise multivariada (Regressão de Cox).

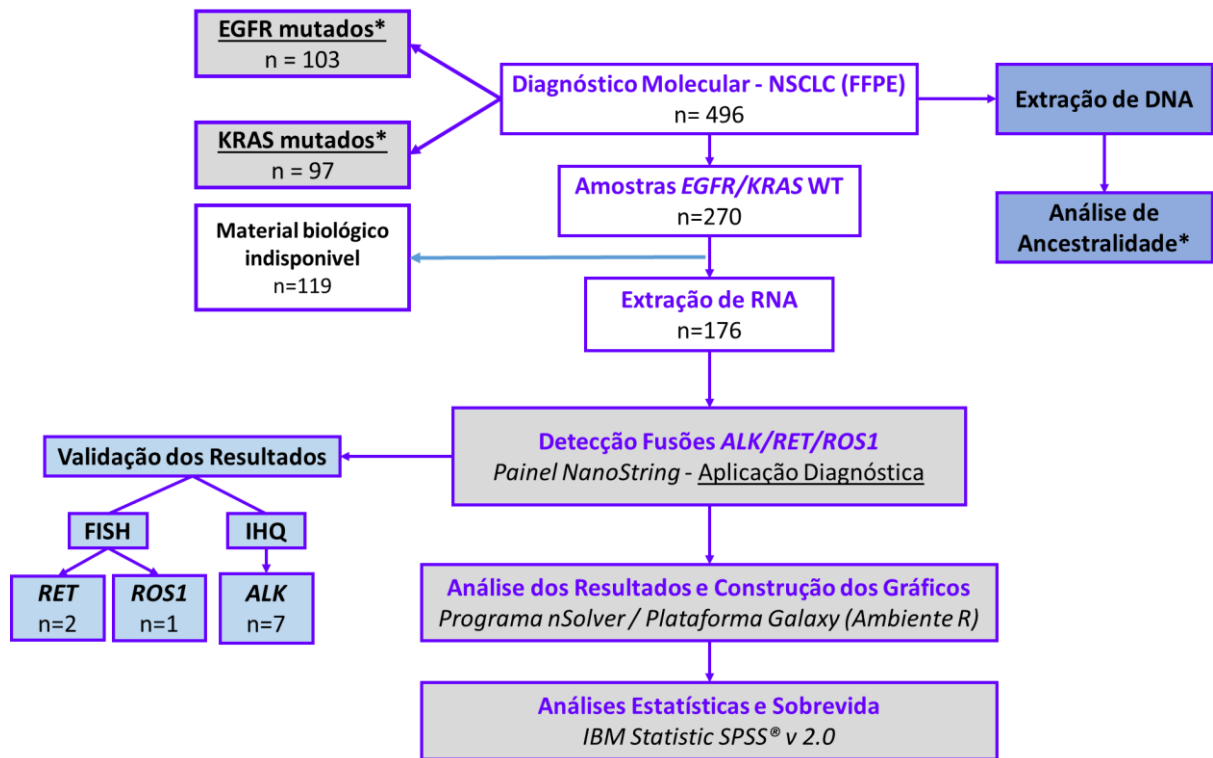


Figura 15. Fluxo de trabalho das principais etapas do presente projeto. * Dados previamente publicados ¹⁰.

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo obedece aos critérios éticos em conformidade com a resolução CNS 466/12 (Norma Operacional n.º 001/2013). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa (CEP) do HCB (Projeto no. 630/2012; CAAE: 05744712.3.0000.5437).

6. RESULTADOS

Dos 496 casos diagnosticados com câncer de pulmão, previamente testados para o status mutacional do gene *EGFR* e do gene *KRAS*¹⁰, 295 casos *wildtype* para mutações nos genes *EGFR* e *KRAS* foram considerados elegíveis para o presente estudo. Destes, 119 não tinham mais material biológico disponível, totalizando 176 amostras para avaliação das fusões genicas. Foi realizada a extração de RNA dos 176 casos e a quantificação do RNA isolado, com uma taxa de sucesso de 84% na obtenção de RNA (100-300ng). Foram excluídos 28 casos devido a baixa concentração (<10ng/uL) obtida para atingir o *input* mínimo (100ng) para a realização do protocolo de detecção dos rearranjos de interesse (**Figura 16**).

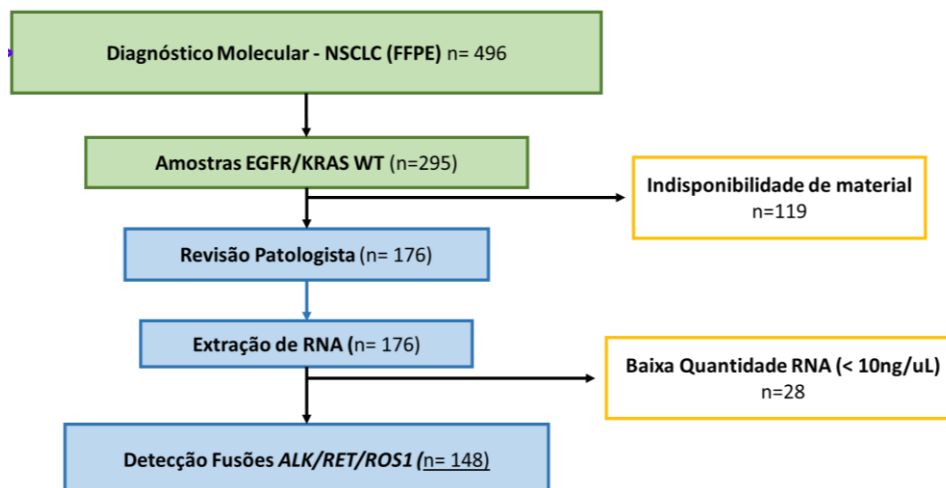


Figura 16. Esquema representativo do fluxo de amostras desde a separação das amostras no diagnóstico molecular, verificação de disponibilidade de bloco de parafina na patologia até a inclusão dos pacientes e detecção dos rearranjos gênicos.

6.1 Características dos pacientes e desfecho clínico

Obtivemos assim uma cobertura de 50,5%(148/295) dos casos *EGFR/KRAS wildtype* para a avaliação da presença de rearranjos. As principais características clinicopatológicas dos 148 casos analisados *EGFR/KRAS wildtype* estão resumidas na Tabela 5. A maioria dos casos é do sexo masculino (65,5%), com histórico tabagista ativo ou passado (67,5%), pacientes auto-declarados de cor branca (79%), de estadiamento avançado (n= 68,2%), sendo a maioria

destes apresentaram metástases em múltiplos órgãos (41,2%). O tipo histológico mais frequentemente observado foi o adenocarcinoma (90%).

Tabela 5. Dados clínicos e sóciodemográficos dos pacientes com câncer de pulmão *wildtype* para EGFR e KRAS (n=148).

Varáveis	Parâmetros	n
Idade ¹ , média em anos	60	148 (100)
Sexo	Masculino	97 (65,5)
	Feminino	51 (34,5)
Raça auto-declarada ³	Branco	117 (79)
	Pardo	20 (13,5)
	Negro	17 (11,5)
	Amarela	1 (0,7)
Status Tabagismo	Não Fumante	30 (20,2)
	Fumante	62 (42,9)
	Ex-fumante	38 (26)
Metástase ao Diagnóstico	Não	45 (30,4)
	Único órgão	42 (28,3)
	Múltiplos órgãos	61 (41,2)
Estadiamento ao Diagnóstico	I/II	19 (12,8)
	III	28 (19)
	IV	101 (68,2)
PS ECOG	0	13 (20)
	1	74 (50)
	2	26 (17,5)
	3 ou 4	32 (21,6)
Emagrecimento ⁴	Não	68 (46)
	<10%	48 (32,4)
	>10%	24 (16,2)
Histologia	Adenocarcinoma	133 (90)
	Carcinoma Escamoso	11 (7,4)
	Adenoescamoso	2 (1,3)
	Outros	1 (0,7)

¹Idade média (variação); ²Informação não disponível; ³Raça auto-declarada segundo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); ⁴Perda de peso <10% e > 10% do peso corporal total.

6.2 Análise univariada de Sobrevida Global

A sobrevida global para os pacientes com câncer de pulmão não pequenas células, foi de, aproximadamente, 9,4% em 5 anos, com uma estimativa do tempo médio de sobrevida de aproximadamente 12,8 meses (IC95%: 8,332 – 17,325) (**Figura 17**).

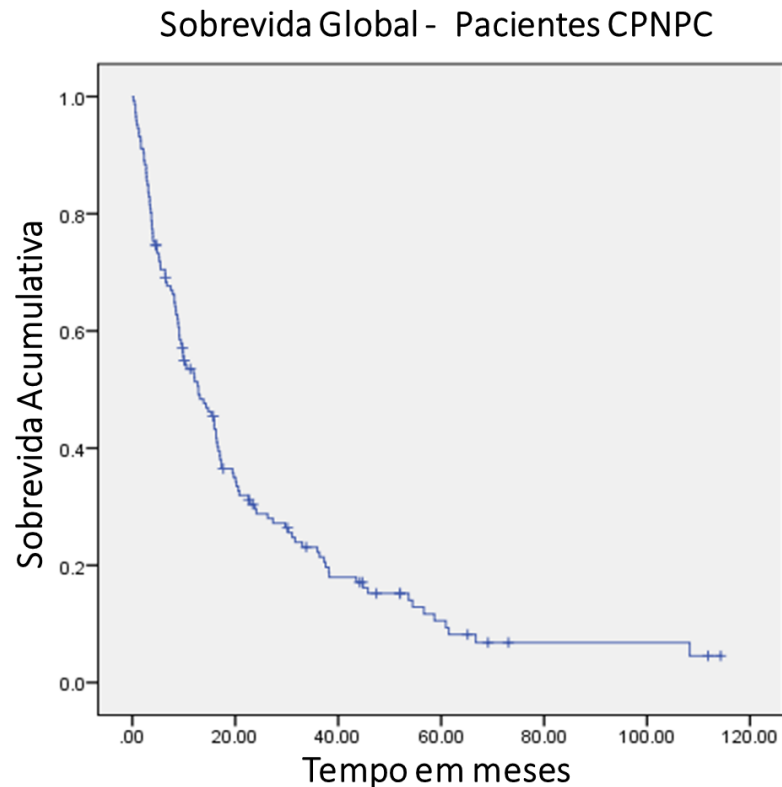


Figura 17. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com câncer de pulmão não-pequenas células *EGFR/KRAS-wildtype* (OS mediana = 12,8 meses).

A sobrevida global para pacientes com estadiamento da doença avançado foi significativamente menor do que os pacientes com estadiamento inicial ($p < 0,0001$; **Figura18**)(**Tabela 6**). Pacientes com presença de metástase ao diagnóstico apresentaram sobrevida global significativamente menor do que entre pacientes sem a presença de metástases ao diagnóstico $p < 0,0001$; **Figura19**)(**Tabela 6**). Pacientes com perda de peso igual ou maior que 10% apresentaram sobrevida global significativamente menor do que entre pacientes sem perda peso ($p < 0,0001$; **Figura20**)(**Tabela 6**). A sobrevida global dos pacientes

com PS ECOG 3 ou 4 ao diagnóstico foi significativamente menor do que entre os pacientes com PS ECOG de escores menores ao diagnóstico ($p > 0,0001$; **Figura 21**)(**Tabela 6**). Pacientes com maior proporção de ancestralidade asiática apresentaram uma sobrevida significativamente maior do que entre os pacientes com menor ancestralidade asiática ($p > 0,01$; **Figura 22**)(**Tabela 6**).

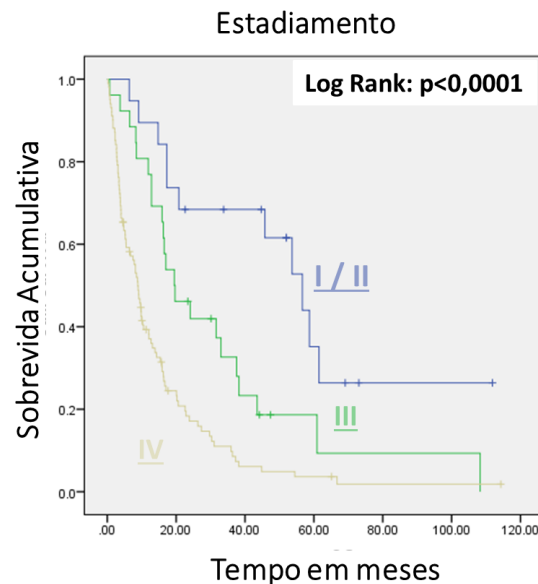


Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* de acordo com estadiamento ao Diagnóstico. O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.

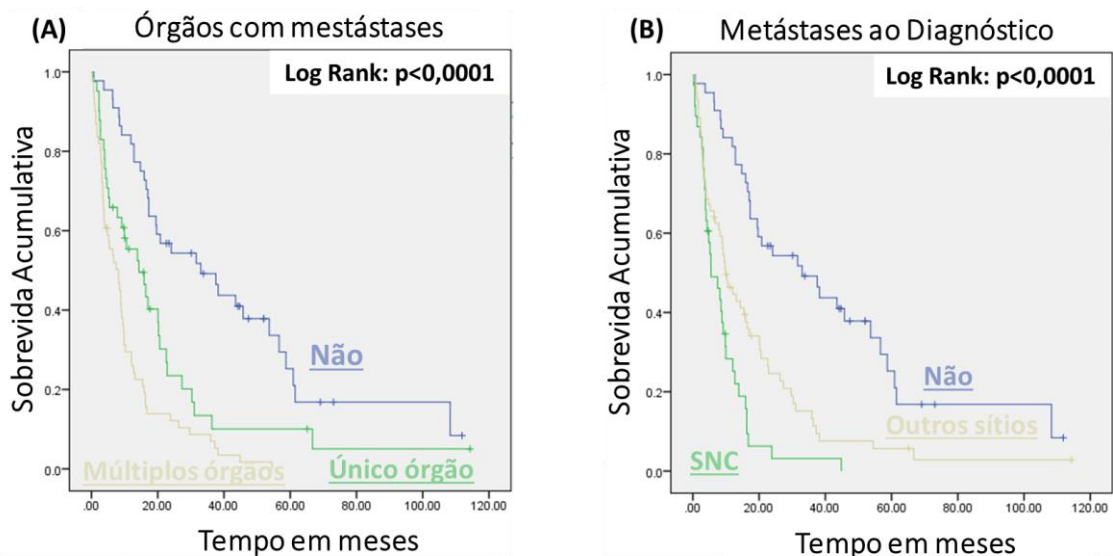


Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* de acordo com a presença de metástase ao diagnóstico (A) e com o sítio de metástases ao diagnóstico doença (B). O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.

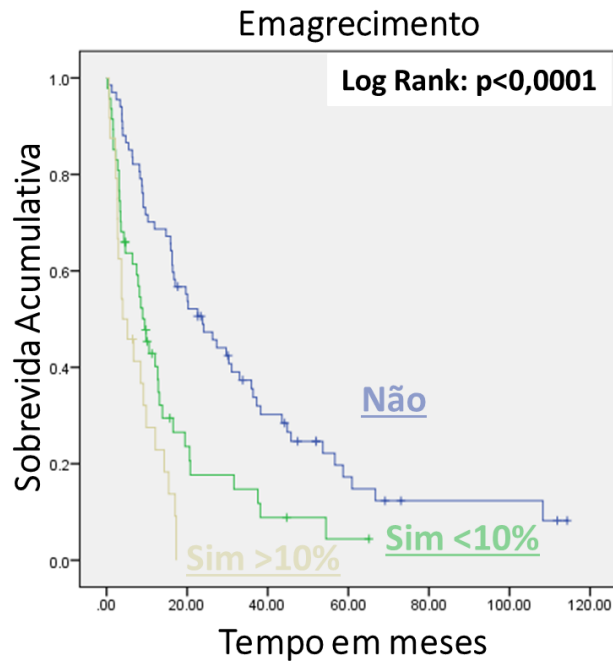


Figura 20. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* de acordo com o emagrecimento. O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.

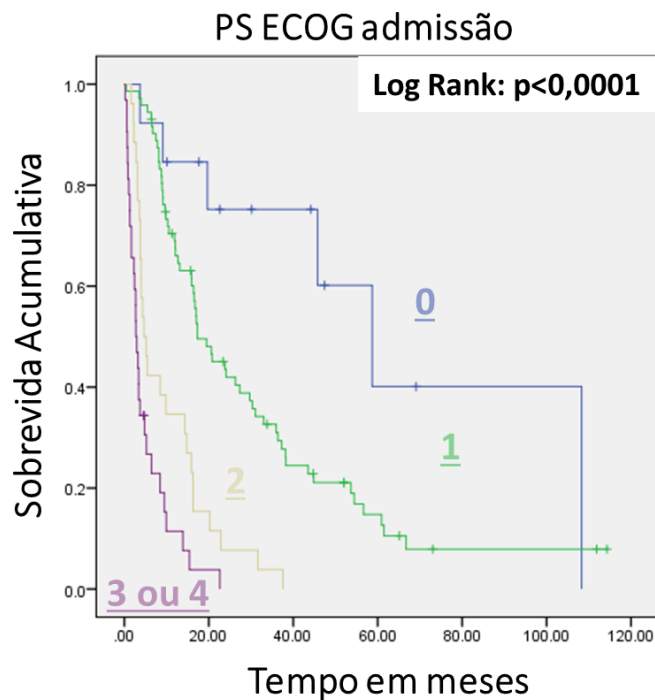


Figura 21. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* de acordo com o status de desempenho do ECOG na admissão do paciente. O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultado

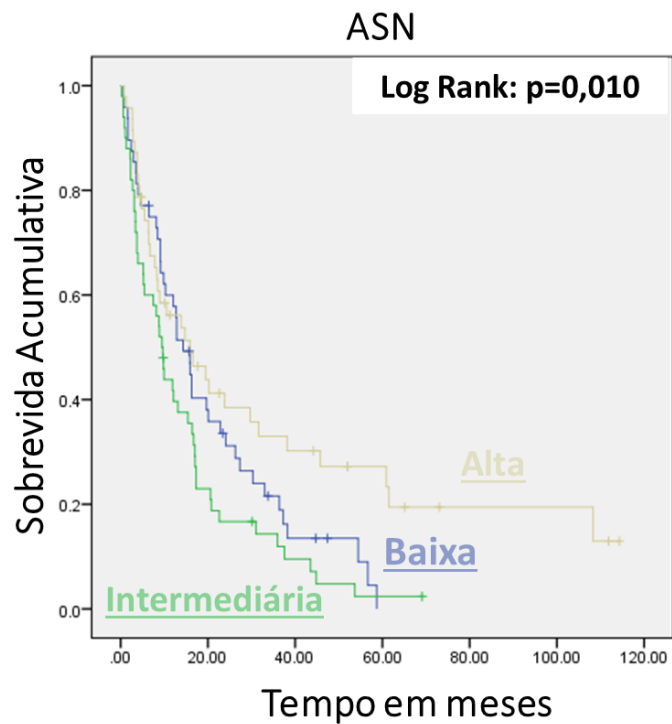


Figura 22. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* de acordo com a ancestralidade asiática (ASN). O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.

Não houve associação significativa da sobrevida global com sexo (masculino e feminino), raça e status de tabagismo (nunca; ativo e passado) (Figuras 23 e 24, respectivamente).

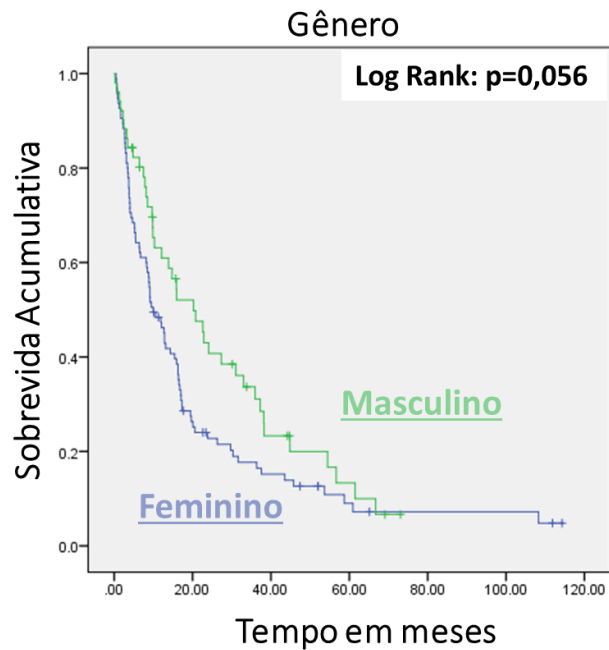


Figura 23. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* de acordo com o sexo dos pacientes. O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.

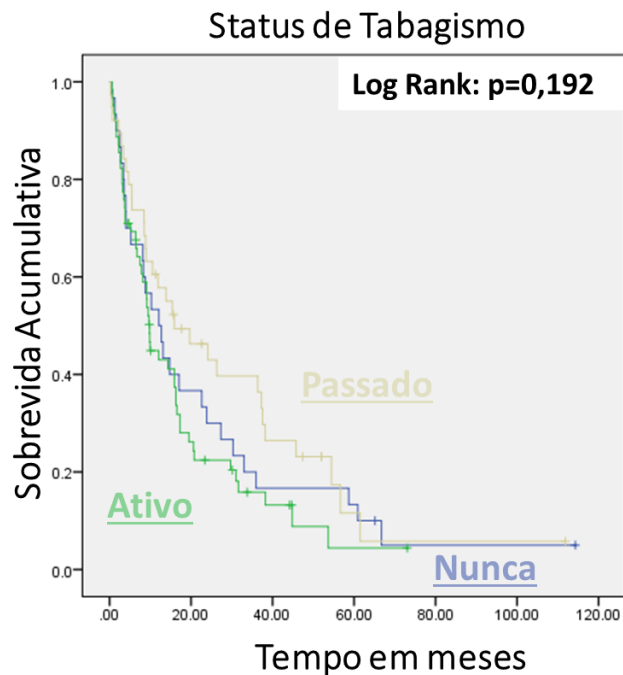


Figura 24. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes com CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* de acordo com tabagismo. O tempo de sobrevivência é apresentado em meses; Os valores de p estão relacionados aos resultados do teste Log-rank.

Tabela 6. Estimativa de Sobrevida Global por método Kaplan-Meier para variáveis clínicas e moleculares da casuística (n=148).

Variável	n Total	Nº Eventos	Sobrevida global			Estimativa (\tilde{x})	IC 95%		p-valor	
			1 ano	3 anos	5 anos	mediana	Inferior	Superior		
Geral	146	124	52%	21,4%	9,4%	12,83	8,332 – 17,325		-----	
Idade	< 60 anos	71	61	49,9%	17,4%	6,6%	12,057	9,189 – 14,926		0,371
	>= 60 anos	75	63	53,9%	26,6%	14,6%	14,324	7,771 – 20,878		
Gênero	Masculino	95	84	35,9%	16,4%	7,2%	9,934	6,847 – 13,021		0,056
	Feminino	51	40	60,9%	31,1%	10%	20,230	11,693 – 28,768		
Raça autodeclarada	Branco	115	99	53,1%	19%	9,4%	12,829	8,099 – 17,559		0,426
	Parda	20	16	55%	40%	9,9%	13,882	3,978 – 23,785		
	Negra	7	5	42%	-	-	8,947	8,750 – 9,144		
	Amarela	1	1	-	-	-	38,177	-		
Tabagismo	Nunca	30	28	50%	16,7%	13,3%	12,105	6,330 – 17,881		0,192
	Tabagista	62	51	43%	15,9%	4,4%	9,823	8,821 – 10,826		
	Ex-tabagista	38	30	57,8%	36,4%	10,6%	15,869	2,259 – 29,478		
Metástase	Não	44	32	81,8%	49,2%	25,2%	33,026	13,33 – 53,019		<0,0001
	Sim - SNC	38	35	25,2%	3,1%	-	5,487	1,647 – 9,326		
	Sim - Outros	64	57	44,6%	13,3%	5,7%	9,868	6,466 – 13,271		
Estadiamento	I – II	19	11	89,5%	68,4%	35,2%	56,678	40,447 – 72,908		<0,0001
	III	26	22	76,9%	32,6%	9,3%	19,483	10,256 – 28,709		
	IV	101	91	38,2%	9,8%	3,7%	8,871	7,156 – 10,585		
PS ECOG	0	13	6	84,6%	75,2%	40,1%	58,717	33,657 – 83,777		<0,0001
	1	72	59	68,9%	31%	12,6%	17,31	10,312 – 24,316		
	2	26	26	34,6%	3,8%	-	4,671	2,871 – 6,471		
	3 e 4	32	30	11,5%	-	-	2,730	2,002 – 3,459		
EMAGRECIMENTO	Não	67	54	68,7%	35,6%	17,3%	23,849	15,556 – 32,142		<0,0001
	Sim <10%	47	39	40,2%	14,7%	4,4%	9,474	6,640 – 12,308		
	Sim >10%	24	23	22,9%	-	-	4,013	0,456 – 7,570		

6.3 Detecção dos rearranjos gênicos

6.3.1 ALK

A partir da análise de 148 casos CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* foram identificadas 21 amostras positivas (14,2%) para rearranjos de *ALK* (Figuras 25). Dentre os rearranjos encontrados, a plataforma NanoString identificou o parceiro de rearranjo em 7 amostras com rearranjos *ALK* (*EML4-ALK*).

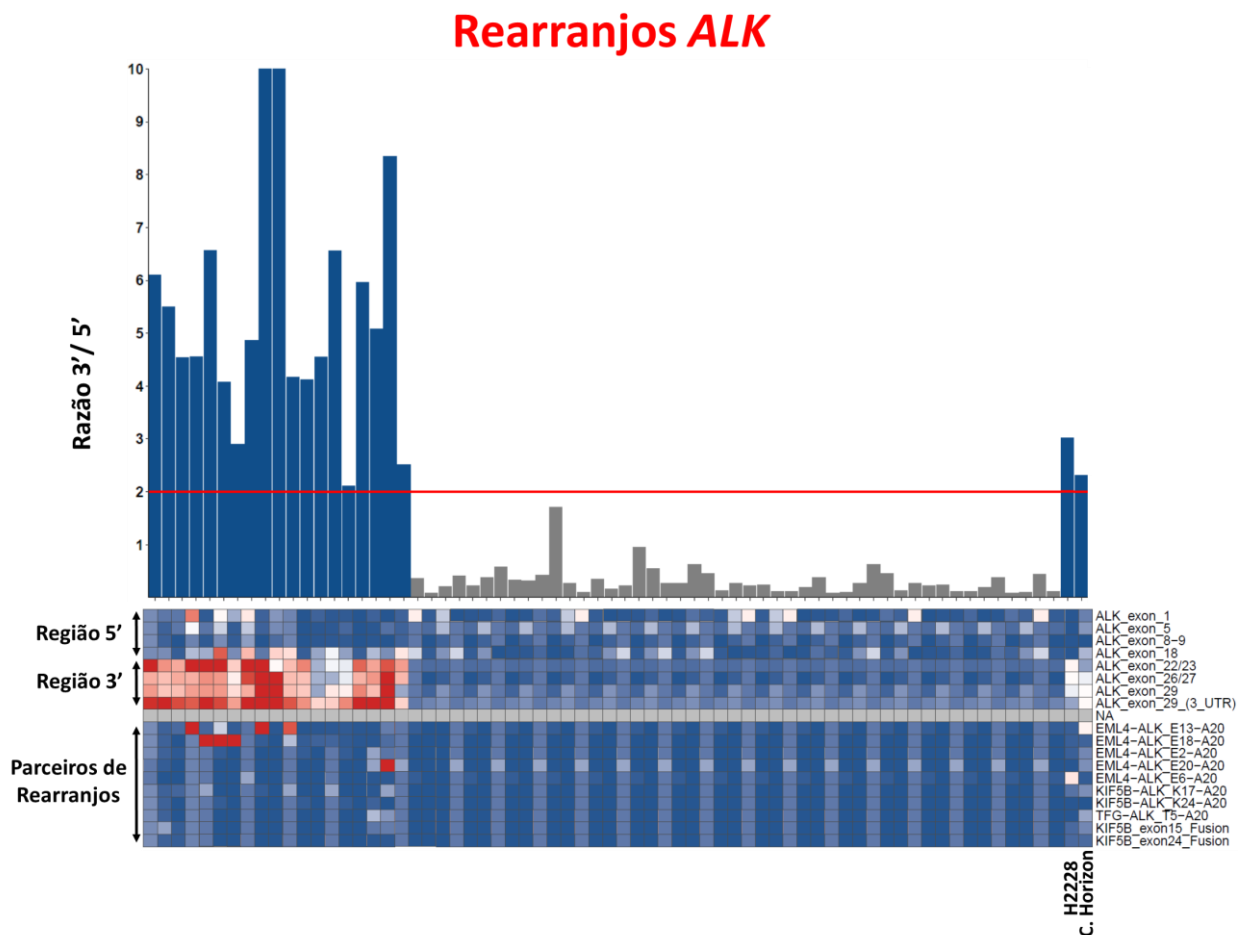


Figura 25. Casos CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* – Frequência rearranjos *ALK*. Gráfico de rearranjos do gene *ALK* identificados nas amostras analisadas (*cut-off* = 2 para rearranjos *ALK*)^{96, 104}. Foram utilizados amostra controles na pesquisa dos rearranjos: Linhagem H2228 (Positiva para rearranjos *ALK*); Controle Horizon (controle comercial positivo para rearranjos *ALK*, *RET* e *ROS1*)

6.3.2 Validação dos rearranjos ALK (IHQ)

Dentre as amostras que foram analisadas para pesquisa da presença de rearranjos do gene *ALK*, em 7 delas foi realizado previamente. Observamos uma concordância de 85% entre os resultados obtidos pela imunohistoquímica e do painel Elements XT (6 amostras: 4 positivas e 2 negativas). No entanto, uma amostra foi discordante quanto a informação da presença de rearranjo, sendo positiva pela imunohistoquímica e negativa por Nanostring. Para esta amostra houve um baixo número de contagem de sondas para realização da análise da presença do rearranjo. Para elucidar a diferença, tentou-se realizar a repetição e avaliação da amostra por outra metodologia, no entanto, isto não possível devida à inexistência de mais material biológico disponível.

6.3.3 Rearranjos ALK e associação com variáveis clínico-patológicas

Ao avaliar a presença de rearranjo do gene *ALK* com as variáveis clínico patológicas dos pacientes, observou que a presença de rearranjos *ALK* associou-se a menor idade ao diagnóstico ($p=0,024$; **Tabela 8**), com o status de tabagismo em pacientes não-fumantes ($p<0,001$; **Tabela 8**), com pacientes com doença avançada ($p=0,01$; **Tabela 8**) e presença de metástases em múltiplos órgãos ($p<0,001$; **Tabela 8**). Não foi observada associação da presença de rearranjos gene *ALK* com as variáveis de sexo, cor da pele, PS ECOG, histologia e com perda de peso (Tabela 8).

Tabela 7. Análises univariada de associação entre rearranjos *ALK* e características clinicopatológicas dos pacientes CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* (n = 148).

Variáveis	Parâmetros	n Total	Rearranjos <i>ALK</i>		p-valor
			Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Idade	≤ 60 anos	72	57 (79,2)	15 (20,8)	0,024
	> 60 anos	76	70 (92,1)	6 (7,9)	
Sexo	Masculino	97	87 (89,7)	10 (10,3)	0,062
	Feminino	51	40 (78,4)	11 (21,6)	
Cor da pele/Raça	Branca	117	103 (87)	14 (12)	0,058
	Parda	20	15 (75)	5 (25)	
	Negra	7	6 (85,7)	1 (14,3)	
	Amarela	1	0 (0)	1 (100)	
Status de Tabagismo	Nunca fumante	30	19 (63,3)	11 (36,7)	0,001
	Fumante ativo	62	58 (93,5)	4 (6,5)	
	Fumante passado	38	33 (86,8)	5 (13,2)	
Estadiamento	I/II	19	19 (100)	0 (0)	0,010
	III	28	27 (94,6)	1 (3,6)	
	IV	101	81 (80,2)	20 (19,8)	
PS ECOG	0	13	12 (92,3)	1 (7,7)	0,484
	1	74	63 (85,1)	11 (14,9)	
	2	26	22 (84,6)	4 (15,4)	
	3	23	21 (91,3)	2 (8,7)	
	4	9	6 (66,7)	3 (33,3)	
Metástase ao Diagnóstico	Sem metástase	45	44 (97,8)	1 (2,2)	0,001
	Único órgão	42	38 (90,5)	4 (9,5)	
	Múltiplos órgãos	61	45 (73,8)	16 (26,2)	
Histologia	Adenocarcinoma	133	112 (84,2)	21 (15,8)	0,659
	Carcinoma Escamoso	11	11 (100)	0 (0)	
	Adenoescamoso	2	2 (100)	0 (0)	
	Outras histologias	1	1 (100)	0 (0)	
Perda de peso*	Não	68	59 (86,8)	9 (13,2)	0,841
	< 10%	48	40 (83,3)	8 (16,7)	
	> 10%	24	21 (87,5)	3 (12,5)	

* Perda de peso <10% and >10% do peso corporal total. PS ECOG, performance status ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group.).

A sobrevida global média em pacientes com CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* que apresentavam rearranjo *ALK* foi de 10,25 meses (IC95% - 0,96,9) e 12,82 meses para pacientes sem rearranjo *ALK* (IC 95% - 8,33-217,32 | Lok-rank p = 0,431) (**Figura 26**).

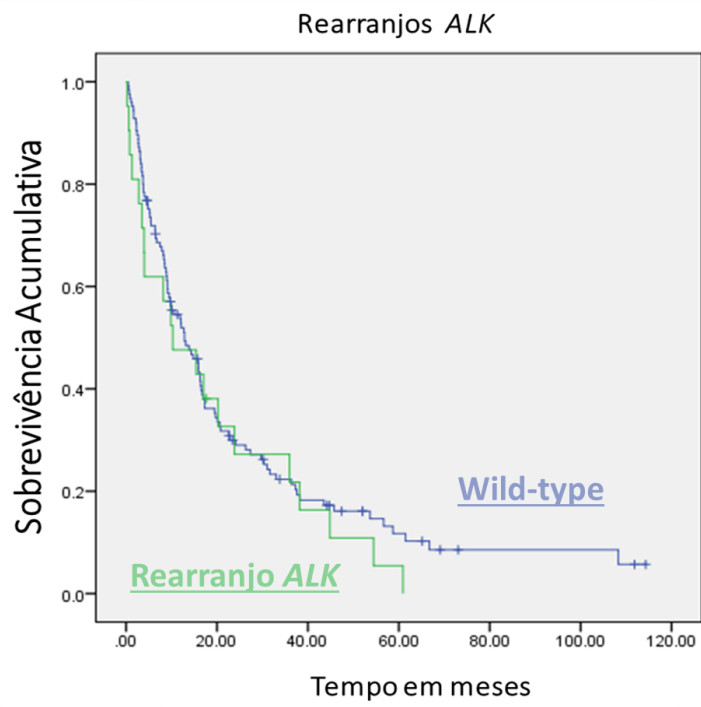


Figura 26. Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global de pacientes baseado no status de rearranjos ALK (OS mediana = 12,82 meses | Log Rank: $p= 0,431$).

6.3.4 RET

A partir da análise de 148 casos CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* foram identificadas 2 (1,3%) amostras positivas para *RET* (**Figuras 27**). Não foi identificado nenhum parceiro conhecido dos rearranjos em nosso painel.

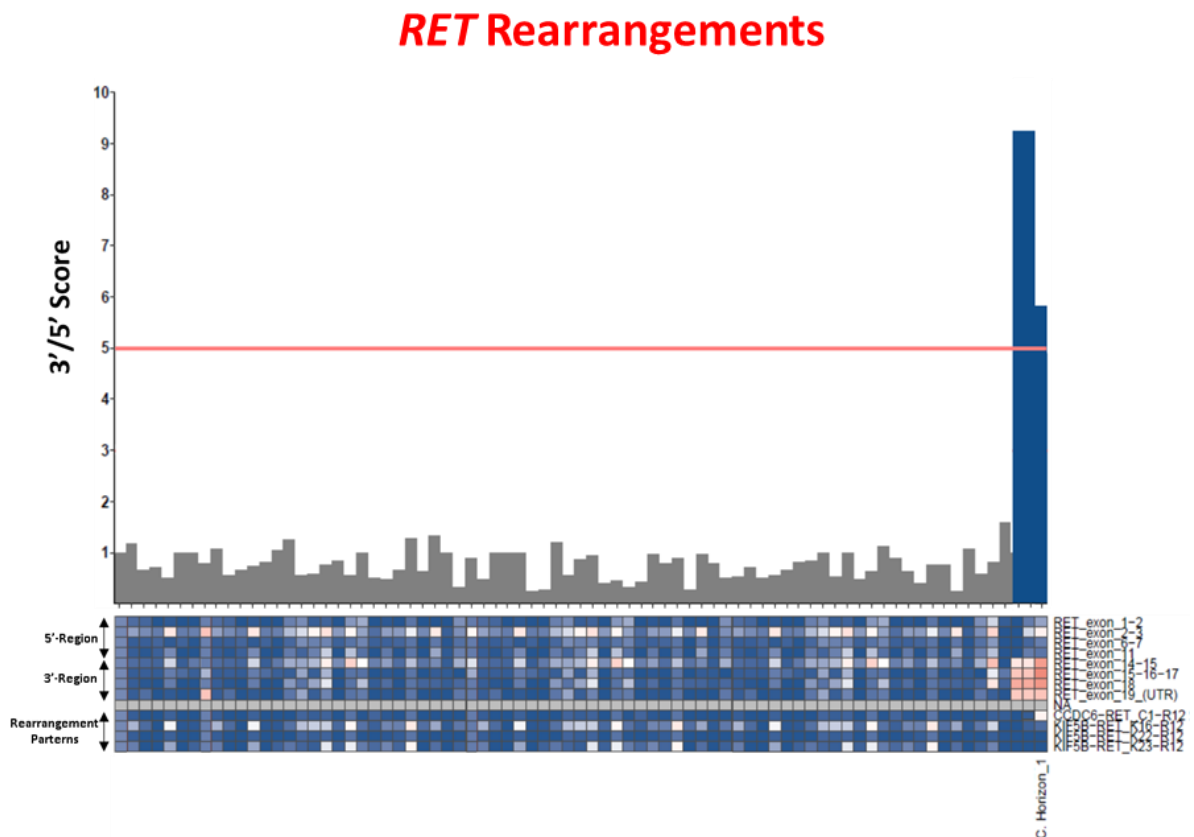


Figura 27. Gráfico de rearranjos do gene *RET* identificados nas amostras analisadas (**cut-off = 5** para rearranjos *RET*)^{96, 104}. Foram utilizadas amostras controles na pesquisa dos rearranjos: Linhagem (Positiva para rearranjos *RET*); Controle Horizon (controle comercial positivo para rearranjos *ALK*, *RET* e *ROS1*).

Ambos os pacientes identificados com os rearranjos de *RET* ambos são do sexo masculino, com 36 e 72 anos de idade, auto-declarados branco, nunca fumantes, em estágio IV, com metástases pulmonares e no SNC e tipo histológico de adenocarcinomas. Não foi possível realizar teste estatísticos para casos *RET* positivos devido ao baixo número positivo de amostras.

6.3.5 Confirmação dos rearranjos *RET* (FISH)

Para as amostras positivas para rearranjos do gene *RET* (n=2) pela plataforma NanoString foi realizado a técnica de FISH para validação dos rearranjos. Em ambas as amostras analisadas, o resultado por FISH foi declarado como inconclusivo, devido à inexistência ou baixa visualização de sinais de marcação fluorescentes para avaliação da presença dos rearranjos. O teste foi repetido e o resultado que se manteve foi inconclusivo (**Figura 28**). Uma das dificuldades em análises por FISH é a necessidade de uma boa qualidade do material de tecido a ser utilizado. Nossas amostras pertencem a um conjunto antigo de blocos da patologia, e a qualidade do material torna-se comprometida devido ao tempo parafinado e aos fixadores utilizados para parafinização dos tecidos.

Para validarmos os rearranjos foi realizado um painel de NGS específico de fusões, uma vez que a técnica de FISH não conseguiu avaliar as amostras de tecidos.

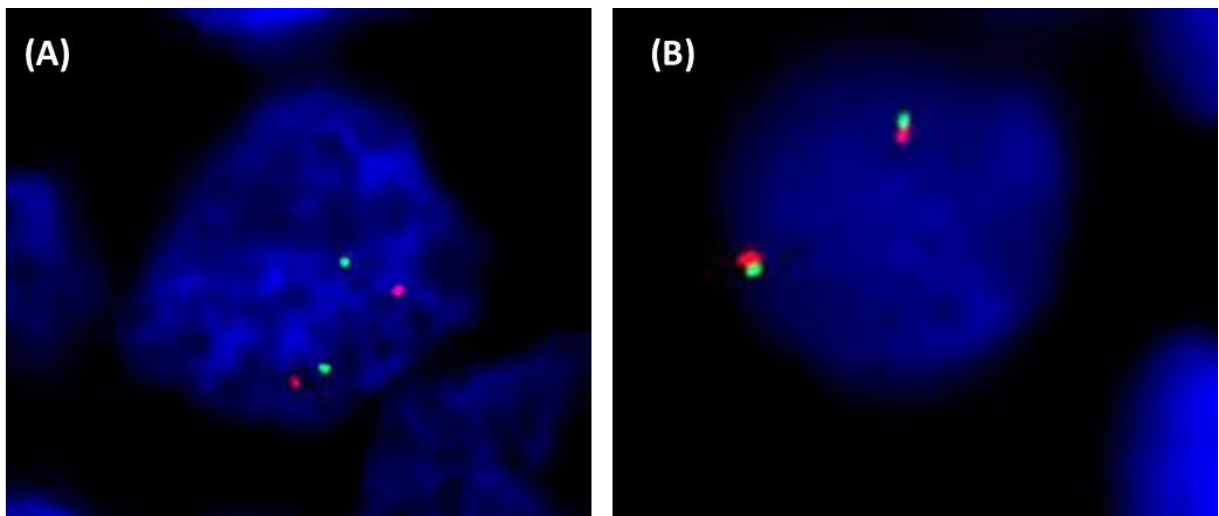


Figura 28 Representação da hibridação in situ de casos positivos para rearranjos (A) *RET* (n = 2) pela plataforma NanoString (aumento de 100x). Métodos repetidos duas vezes em ambas as amostras e o resultado da análise considerado "inconclusivo" (baixa visualização do sinal de hibridação). (B) Controle para rearranjo *RET*.

6.3.6 ROS1

A partir da análise de 148 casos CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* foram identificadas 1 (0,7%) amostra positiva para *ROS1* (**Figuras 29**). O paciente identificado com o rearranjo de *ROS1* é do sexo feminino, 69 anos de idade, auto-declarada branca, nunca fumante, em estágio IV, com metástases linfonodais e tipo histológico de adenocarcinomas. Não foi identificado nenhum parceiro conhecido dos rearranjos em nosso painel. Não foi possível realizar teste estatísticos para caso *ROS1* positivo devido ao baixo número amostral.

ROS1 Rearrangements

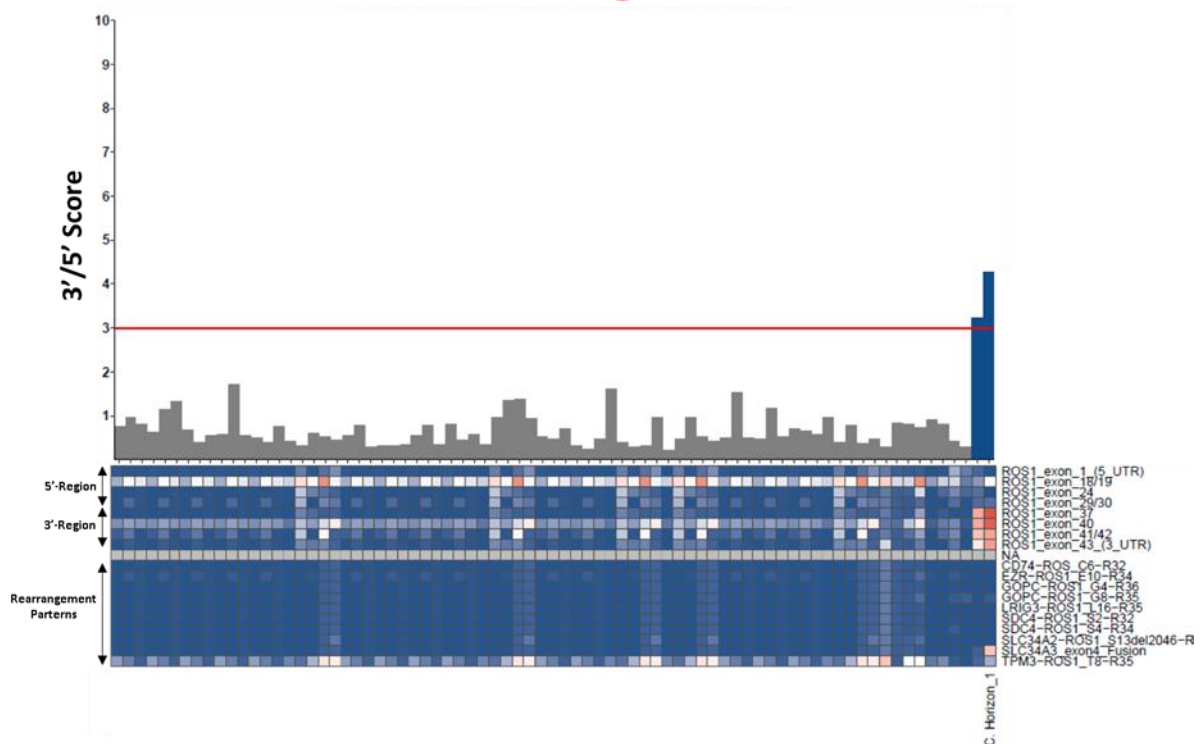


Figura 29. Casos CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* – Frequência rearranjos *ROS1*. Gráfico de rearranjos do gene *ROS1* nas amostras analisadas (**cut-off = 3** para rearranjos *ROS1*)^{96, 104}. Foram utilizados amostra controles na pesquisa dos rearranjos: Controle Horizon (controle comercial positivo para rearranjos *ALK*, *RET* e *ROS1*).

6.3.7 Confirmação dos rearranjos ROS1 (FISH)

Para única amostra positiva para rearranjo do gene *ROS1* pela plataforma NanoString foi realizado a técnica de FISH para validação do rearranjo. O resultado obtido, como nos casos

RET positivos, foi declarado como inconclusivo, devido à inexistência ou baixa visualização de sinais de marcação fluorescentes para avaliação da presença dos rearranjos. O teste foi repetido e o resultado que se manteve foi inconclusivo (**Figura 30**). Tal como anteriormente mencionado, uma das dificuldades em análises por FISH é a necessidade de uma boa qualidade do material de tecido a ser utilizado. Nossas amostras pertencem a um conjunto antigo de blocos da patologia, e a qualidade do material torna-se comprometida devido ao tempo parafinado e aos fixadores utilizados para parafinização dos tecidos. Para validarmos os rearranjos foi realizado um painel de NGS específico de fusões, uma vez que a técnica de FISH não conseguiu avaliar as amostras de tecidos.

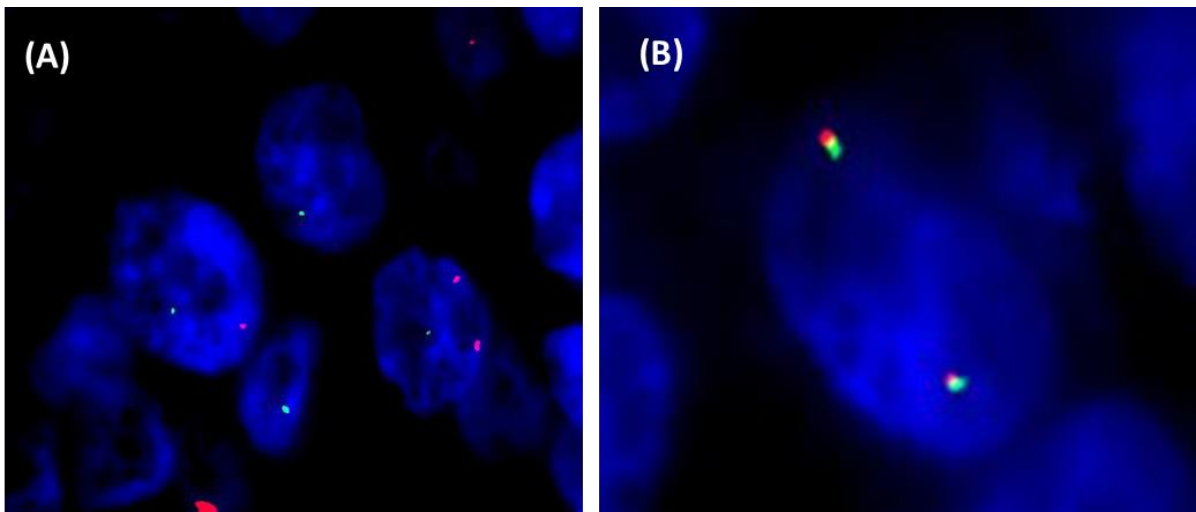


Figura 30. Representação da hibridação in situ do caso positivo para rearranjo (A) *ROS1* (n = 1) pela plataforma NanoString (aumento de 100X). Métodos repetidos duas vezes em ambas as amostras e o resultado da análise considerado "inconclusivo" (baixa visualização do sinal de hibridação). (B) Controle *ROS1*.

6.3.8 Confirmação dos rearranjos do gene *RET* e *ROS1* por NGS

Para a realização da investigação da presença dos rearranjos dos genes *RET* e *ROS1*, pelo painel comercial Archer® FusionPlex® Lung, primeiramente foi realizado um teste de controle qualidade para aprovação das amostras para seguimento do protocolo. No entanto, ao realizar o controle de qualidade para a realização do painel, nenhuma das amostras foi elegível para as etapas subsequentes por apresentar baixa qualidade do material. Dessa

forma, não foi possível dar seguimento ao protocolo de NGS, nem validar a positividade das amostras.

6.4 Análise de Ancestralidade

As proporções médias de ancestralidade para os casos de CPNPC *EGFR/KRAS wildtype* analisados (n = 148) observadas entre os indivíduos foram 75% para o EUR, 12,5% para o AFR, 5,8% para o AME e 6,4% para o ASN (**Figura 31**). As proporções médias de ancestralidade para os casos positivos para rearranjos do gene *ALK* foram 68,3% para o EUR, 15,7% para o AFR, 6,9% para o AME e 9,6% para o ASN (**Figura 31**). Ao analisar as proporções de ancestralidade de acordo a naturalidade dos pacientes investigados, observa-se que os pacientes oriundos da região nordeste apresentam maior ancestralidade africana comparada principalmente a região sul do país (**Figura 32**). O estado com maior número de pacientes estudados foi São Paulo, sendo observado uma distribuição mais equilibrada das proporções de ancestralidade.

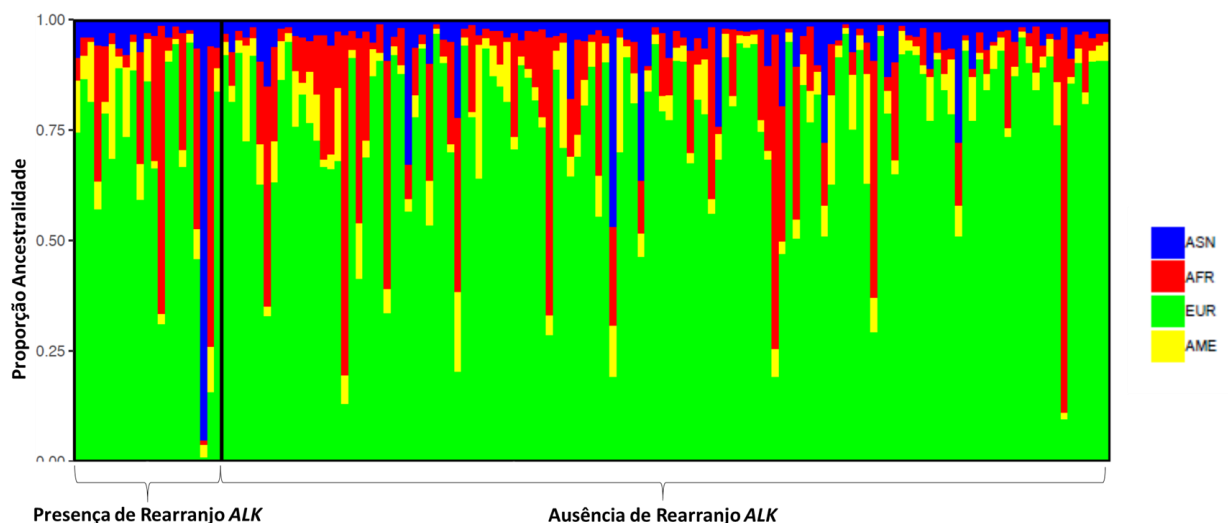


Figura 31. Representação de ancestralidade genética dos casos analisados, divididos em 2 grupos (*ALK* positivo e *ALK* negativo). Os grupos ASN, AFR, EUR, AME foram usados como populações de referência. ASN, ancestralidade asiática (em azul); AFR, ancestralidade africana (em vermelho); EUR, ancestralidade europeia (em verde); AME, ancestralidade ameríndia (em amarelo).

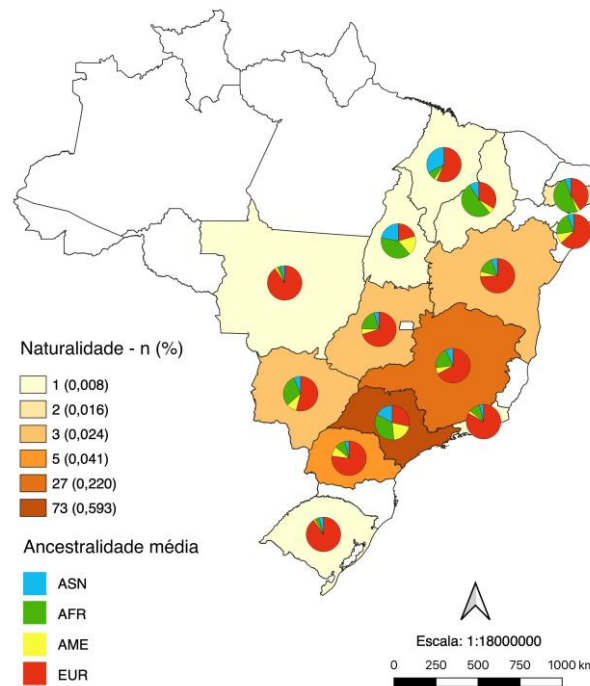


Figura 32. Representação gráfica dos estados de naturalidade e as proporções médias de ancestralidade por estado dos pacientes avaliados no presente estudo. ASN, ancestralidade asiática; AFR, ancestralidade africana; EUR, ancestralidade europeia; AME, ancestralidade ameríndia.

Tabela 8. Análises de associação entre rearranjos *ALK* e ancestralidade dos pacientes CPNPC *EGFR/KRAS-wildtype* (n = 148).

Variáveis	Parâmetros	n Total	Rearranjos <i>ALK</i>		p-valor
			Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Ancestralidade ASN	Baixa	49	44 (89,8)	5 (10,2)	0,452
	Intermediária	51	44 (86,3)	7 (13,7)	
	Alta	47	38 (80,9)	9 (19,1)	
Ancestralidade AFR	Baixa	48	42 (87,5)	6 (12,5)	0,863
	Intermediária	50	43 (86)	7 (14)	
	Alta	49	41 (83,7)	8 (16,3)	
Ancestralidade AME	Baixa	50	44 (88)	6 (12)	0,357
	Intermediária	47	42 (89,4)	5 (10,6)	
	Alta	50	40 (80)	10 (20)	
Ancestralidade EUR	Baixa	48	39 (81,2)	9 (18,8)	0,445
	Intermediária	48	41 (85,4)	7 (14,6)	
	Alta	51	46 (90,2)	5 (9,8)	

ASN, ancestralidade asiática; AFR, ancestralidade africana; EUR, ancestralidade europeia; AME, ancestralidade ameríndia; ECOG PS, ECOG performance status (Eastern Cooperative Oncology Group). * Análise realizada apenas com as amostras FFPE, que continham os dados de ancestralidade completo

Tabela 9. Estimativa de Sobrevida Global para rearranjos do gene *ALK* e ancestralidade (n=148).

VARIÁVEL		n total	nº eventos	SOBREVIDA GLOBAL			ESTIMATIVA (\tilde{x})	IC 95%		p-valor
				1 ano	3 anos	5 anos		Inferior	Superior	
REARRANJOS <i>ALK</i>	Não	125	104	52,8%	21,3%	11,7%	12,829	7,739 – 17,918		0,431
	Sim	21	20	47,6%	21,8%	5,4%	10,251	0,000 – 21,072		
ANCESTRALIDADE	Baixa	48	42	57,8%	21,6%	-	14,324	10,149 – 18,500		0,010
ASN	Intermediária	50	47	39,7%	11,9%	2,4%	9,474	7,489 – 11,458		
	Alta	47	34	56,1%	33%	7,1%	15,888	5,208 – 26,569		

6.5 Análise Multivariada de características clinicopatológicas e desfecho clínico dos pacientes

O modelo final das análises por regressão de COX foi composto pelas variáveis presença de metástases ao diagnóstico, órgãos com metástases, emagrecimento e PS ECOG na admissão (**Tabela 10**). O status de tabagismo não apresentou associação com a sobrevida dos pacientes. Foi observado um aumento no risco relativo de ir a óbito dos pacientes diagnosticados em estágio avançado com a presença de metástases (RR=0,5; IC95%: 0,319 – 0,867) e com metástase no sistema nervoso central (RR=1,82; IC95%: 1,119 – 3,065) comparados aos pacientes diagnosticados em sem metástase. Foi observada associação entre o PS ECOG na admissão com o desfecho da doença, sendo os pacientes diagnosticados com escore 3 ou 4 apresentaram aumento no risco relativo de ir a óbito (RR=7,27; IC95%: 2,600 – 20,341; $p<0,0001$), quando comparados aos pacientes com escore 0. Para pacientes com emagrecimento maior que 10% ao diagnóstico também apresentaram um risco relativo maior de ir a óbito (RR=3,196; IC95%: 1,739 – 5,873) ($p<0,0001$), quando comparado aos pacientes que não apresentaram emagrecimento.

Tabela 10. Análise multivariada de associação entre características clinicopatológicas e a desfecho de pacientes EGFR/KRAS wild-type.

Variáveis	Parâmetros	RR	IC 95%	p-value
Presença de metástase	Não	-----	Ref.	Ref.
	Único órgão	0,526	0,319 – 0,867	0,012
	Múltiplos órgãos	1,5	-	-
Órgãos com metástases	Não	-----	Ref.	Ref.
	Sim – SNC	1,852	1,119 – 3,065	0,016
	Sim – outros sítios	-	-	-
Perda de peso*	Não	-----	Ref.	Ref.
	Sim < 10%	1,259	0,802 – 1,975	0,317
	Sim > 10%	3,196	1,739 – 5,873	<0,0001
PS ECOG	0	-----	Ref.	Ref.
	1	1,525	0,616 – 3,777	0,362
	2	3,066	3,066 – 1,111	0,031
	3 ou 4	7,272	2,600 – 20,341	< 0,0001

Ref: variável de referência; RR: risco relativo; IC: intervalo de confiança; p-value: significância do teste t. * Perda de peso <10% e >10% do peso corporal total. PS ECOG, performance status ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group.)

6.6 Análise Multivariada de características clinicopatológicas e rearranjos do gene ALK

Para as análises multivariadas foram incluídas todas as variáveis consideradas como significantes ($p < 0,05$) nas análises univariadas. Dessa forma as variáveis sexo, cor da pele, PS ECOG, histologia e perda de peso foram retiradas das análises por não terem associação significativa ($p = 0,062$; $p = 0,058$; $p = 0,484$; $p = 0,659$; $p = 0,841$, respectivamente). Em um primeiro modelo de Regressão Linear, a variável estadiamento foi retirada do modelo por não terem significância na análise multivariada. Dessa forma, o modelo final de análise multivariada foi formado pelas variáveis idade, tabagismo e metástases o diagnóstico.

Para variável idade, os pacientes com idade inferior ou igual a 60 anos apresentaram um risco 3 vezes maior em apresentar rearranjos do gene *ALK* (RR: 3,307; $p = 0,04$)(Tabela 11). Pacientes que nunca fumaram tiveram um risco de ter rearranjos *ALK* 7 vezes maior do que pacientes fumantes ativo (RR: 7,098; $p = 0,004$)(Tabela 11). Para os pacientes que apresentaram metástases ao diagnóstico no sistema nervoso central o risco apresentado foi quase 10 vezes maior do que os pacientes sem metástases ao diagnóstico em terem a presença de rearranjos *ALK* (RR: 9,897; $p = 0,042$)(Tabela 11).

Tabela 11. Análise multivariada de associação entre características clinicopatológicas e a presença de rearranjos ALK.

Variáveis	Parâmetros	n	RR	IC 95%	p-value
Idade	> 60 anos	76	-----	Ref.	Ref.
	≤ 60 anos	72	3,307	1,053 – 10,380	0,040
Tabagismo	Fumante ativo	62	-----	Ref.	Ref.
	Fumante passado	38	2,610	0,602	11,326
	Nunca Fumante	30	7,098	1,898 – 26,539	0,004
Metástase ao diagnóstico	Não	44	-----	Ref.	Ref.
	Sim – SNC	38	9,897	1,090 – 89,881	0,042
	Sim – outros sítios	64	8,417	1,001 – 70,755	0,050

Ref: variável de referência; RR: risco relativo; IC: intervalo de confiança; p-value: significância do teste t

7 DISCUSSÃO

A identificação de rearranjos gênicos apresenta grande relevância terapêutica, possibilitando a melhor direcionamento do tratamento com terapias-alvo dos pacientes com CPNPC. O uso de terapias-alvo moleculares possibilitaram um aumento importante da sobrevida global dos pacientes tratados com inibidores tirosina quinase. Na literatura, a frequência dos rearranjos *ALK*, *RET* e *ROS1* está bem estabelecida em pacientes asiáticos e europeus^{105, 106}. No entanto, há poucos estudos relatando a frequência de rearranjos gênicos em CPNPC em populações miscigenadas, como populações hispânicas e a brasileira¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

O presente estudo apresenta dados de frequência dos rearranjos dos genes *ALK*, *RET* e *ROS1* para a população brasileira, altamente miscigenada com grande predomínio de ancestralidade europeia, mas com percentuais importantes de componente africano e asiático. No Brasil, uma minoria de pacientes com CPNPC é testada quanto a alvos terapêuticos, mesmo que o sistema público de saúde já cubra o gasto de exames para a identificação de mutações do gene *EGFR* e translocações de *ALK*¹⁰⁹. Além disso, os dados são escassos sobre a frequência de rearranjos gênicos com relevância clínica em pacientes brasileiros^{38, 84, 110-112}. Aqui, relatamos a presença de rearranjos de *ALK* analisados pela plataforma NanoString em pacientes brasileiros com CPNPC e *EGFR/KRAS-wildtype*, assistidos no Hospital de Câncer de Barretos, um hospital sem fins lucrativos e com atendimento 100% SUS.

Em nosso estudo, os pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células apresentaram uma sobrevida global em cinco anos de 9,4%. Os pacientes diagnosticados em estadio IV, representando aproximadamente 70% da nossa casuística, apresentaram uma sobrevida global em 5 anos de 3,7%. No Brasil, a estimativa de sobrevida global para pacientes com câncer de pulmão é de 16%^{109, 113}, enquanto a estimativa reportada pelo Globocan é inferior a 20% em 5 cinco anos¹. De acordo com estimativa de 2017 pelo Registro Hospitalar do Hospital de Câncer de Barretos, os pacientes de estadio avançado apresentaram uma sobrevida global igual a 1%. Entre os aspectos clínicos dos pacientes com CPNPC, o emagrecimento ou perda de massa corporal está associada a um pior prognóstico de desfecho^{114, 115}. Este dado é observado em nossa casuística, em que os pacientes que tiveram

perda de peso >10% ao diagnóstico tiveram uma menor sobrevida comparado ao grupo sem perda de peso. O mesmo foi observado em pacientes com PS ECOG igual ou acima de 3.

A frequência observada de rearranjos no gene *ALK* em pacientes com CPNPC na literatura é de cerca de 3-5% e a frequência de rearranjos nos genes *RET* e *ROS1* é de cerca de 2%^{105, 106, 116-118}, variando também de acordo com a etnia da população estudada^{80, 81, 111}. No entanto, este número pode aumentar em estudos com casuísticas enriquecidas (*EGFR/KRAS-wildtype*), variando de 3-8% para os rearranjos do gene *ALK* e de 0,5 a 13% para os rearranjos dos genes *RET* e *ROS1*^{66, 69, 119-121}. É importante ressaltar que os rearranjos são mutuamente exclusivos e com outras mutações de *drivers*^{122, 123}. No presente estudo, observamos uma frequência de rearranjos de *ALK* 14,7% (n = 21/148), *RET* de 1,3% (2/148) e *ROS1* de 0,7% (1/148), nos casos *EGFR/KRAS-wildtype* analisados. Comparando com os dados da literatura, a frequência de rearranjos do gene *ALK* neste estudo mostra-se superior à frequência relatada em outras populações^{105, 106}. No entanto, ao considerar o total de nossa casuística de pacientes com dados das análises moleculares (*EGFR/KRAS/ALK/RET/ROS1*), observamos uma frequência dos rearranjos do gene *ALK* de 6% (21/348). Em um estudo recente realizado em países da América Latina, foi observado uma frequência de rearranjos do gene *ALK* variando de 4,1% a 10,8% (México 7.6%; Colômbia 4.1%; Argentina 6.0%; Costa Rica 9.5%; Panamá 4.4%; Uruguai 5.4%; Chile 8.6%; Venezuela 8.9%; Peru 10.8%)¹⁰⁶. Dois recentes estudos Brasileiros avaliaram a frequência de rearranjos *ALK* em pacientes com CPNPC, um na região Nordeste e outro na região Sul. O estudo realizado na região Nordeste identificou uma frequência de 10,4%, enquanto que no estudo da região Sul a frequência encontrada foi de 4 %^{84, 112}. Nota-se, que frequência do nosso trabalho é próxima ao que é visto nos demais países latinos, porém percebe-se que há uma variação da frequência dos rearranjos *ALK* entre as regiões brasileiras. Tal variação pode ser explicada devido a miscigenação da população brasileira, visto que a ancestralidade é um fator que pode atuar sobre a frequência dos rearranjos *ALK*^{80, 81, 107}.

Em nosso trabalho, além da identificação da presença do rearranjo, também foi possível a identificação do *EML4-ALK* como parceiro de rearranjo do gene *ALK* em alguns casos. A identificação do parceiro de rearranjo tem relevância na prática clínica, uma vez que, a depender da variante encontrada, a resposta ao tratamento com TKI pode ser diferente¹²⁴⁻¹²⁶.

Dessa forma, podemos identificar com maior precisão e sensibilidade os pacientes que teriam melhor resposta ao tratamento de acordo com a variante encontrada.

A presença de rearranjos *ALK* é associada a pacientes nunca fumantes, assim como a pacientes jovens, do sexo feminino e com adenocarcinoma^{107, 127, 128}. Fan e colaboradores, em seu trabalho, observaram que indivíduos jovens apresentaram um maior risco para rearranjos do gene *ALK* independentemente da etnia. No entanto, quando analisado o sexo do paciente, mulheres de origem asiática apresentaram um maior risco para rearranjos do gene *ALK*¹²⁷. Em nosso estudo, foi observada uma associação da presença dos rearranjos com pacientes nunca fumantes, com a presença de metástases e maior risco para os pacientes com metástases no sistema nervoso central. Foi observado também que os pacientes com idade inferior ao diagnóstico têm maior risco de apresentarem rearranjos *ALK*, no entanto, não foi observada associação entre a presença de rearranjos no gene *ALK* com sexo dos pacientes. Dessa forma, podemos afirmar que nossos dados estão em conformidade com o que é apresentado pela literatura^{107, 127}. A frequência de rearranjos *ALK* é relatada em maior número em população de origem asiática em relação à população europeia e outras populações ocidentais^{51, 121, 129, 130}. Ao avaliar a ancestralidade dos pacientes, confirmamos a miscigenação existente na população brasileira, sendo em sua maioria, com ancestralidade europeia, seguida da ancestralidade africana. Não foi identificado nenhuma associação entre a presença de rearranjos no gene *ALK* com a ancestralidade dos nossos pacientes.

Os rearranjos do gene *RET* são observados em tumores de NSCLC em 1 a 2% dos casos, sendo mais frequentemente observados em pacientes com adenocarcinoma e nunca fumantes^{66, 69}. Para rearranjos do gene *ROS1*, a frequência observada é de até 2%, sendo que pacientes positivo para este rearranjo apresenta características semelhantes ao observado em casos *ALK*-positivos (jovens; nunca fumantes)^{78, 81, 117, 119, 125, 126, 131}. . No presente estudo foi identificado uma frequência de 1,3% para rearranjos do gene *RET* e 0,7% para rearranjos do gene *ROS1*, semelhante ao observado na literatura, sendo a primeira vez relatado na população brasileira estes rearranjos. Não foi possível observar associações das características clinicopatológicas dos pacientes CPNPC *EGFR/KRAS*-wildtype com a presença de rearranjos do gene *RET* do gene *ROS1*, devido ao número insuficiente de casos positivos para realização dos testes estatísticos. No entanto, a presença destes rearranjos foi identificada em pacientes não-fumantes e com histologia de adenocarcinomas, como é observado em outros estudos⁷⁸,

^{123, 131, 132}. Para rearranjos *RET*, até o presente momento, não há tratamento aprovado para uso clínico, contudo, estudos clínicos com o inibidor LOXO-292 relatam resultados preliminares promissores em pacientes com o rearranjos do gene *RET*, independentemente do tipo tumoral^{15, 133}. De forma semelhante, foi aprovado recentemente o uso do inibidor seletivo para rearranjos dos genes *NTRK1/2/3*, o laratrectinib, a primeira droga agnóstica para tratamento de pacientes independentemente do tipo tumoral, baseando-se apenas na presença do rearranjo^{40, 41, 58}. Assim, com novas drogas-alvo sendo disponibilizadas para uso clínico, maior o número de pacientes que serão beneficiados por terapias-alvo, aumentando a sobrevida dos pacientes com CPNPC.

A frequência mais alta de rearranjos observada pode ser devida à alta sensibilidade da metodologia de detecção utilizada, a plataforma NanoString. Como observado em um estudo anterior do grupo³⁸, a plataforma NanoString conseguiu analisar amostras de tecido identificando a presença de rearranjos no gene *ALK*, destacando principalmente sua capacidade de analisar amostras degradadas, como nos casos de amostras em parafina. Na tecnologia *nCounter*[®], a identificação dos rearranjos gênicos ocorre por meio de uma hibridação dupla de sondas (repórter / captura) específica para as sequências alvo do rearranjo, lendo e contando os sinais gerados pelas sondas repórter^{38, 88, 96}. A metodologia NanoString é bastante robusta, sensível, fácil de executar, com recursos de análise multiplex e apresenta vantagens superiores à técnica FISH, que é considerada trabalhosa, de alto custo, multiplexagem de baixa potência e pode produzir resultados falso-positivos ou negativos^{88, 98}. As técnicas de FISH e IHQ não permitem a identificação de parceiros de rearranjo, sendo as sondas de fluorescência específicas para o ponto de ruptura do gene rearranjado e anticorpos específicos para o epítipo da proteína originados pelo rearranjo, concentrando-se apenas na presença de rearranjos baseados na região 3' do gene. Empregando nosso painel personalizado, foi possível identificar três tipos de rearranjos (*ALK, RET, ROS1*) e diversos parceiros diferentes. Além disso, o painel pode ser expandido, podendo adicionar novos rearranjos de relevância clínica para CPNPC, como é o caso de rearranjos do gene *NTRK1/2/3* que está em andamento para adição em nosso painel.

O presente estudo tem como limitações a natureza retrospectiva do estudo, uma vez que os pacientes não foram tratados de maneira uniforme, o que configura um viés para as análises de sobrevida. Os pacientes diagnosticados no estágio IV compõem a maioria da nossa

amostra, tornando-se um viés para análises clinicopatológicas entre os estadios da doença. Os casos com rearranjos nos genes *RET* e *ROS1* positivos não puderam ser confirmados por FISH ou NGS, devido ao fato das amostras serem antigas e com baixa qualidade do material, o que torna inviável o bom desempenho das técnicas em questão.

8 CONCLUSÃO

A frequência dos rearranjos do gene *ALK* mostrou-se alta em uma casuística miscigenada, e a frequência dos rearranjos dos genes *RET* e *ROS1* é semelhante ao observado na literatura.

Existe associação da presença de rearranjos do gene *ALK* com pacientes jovens, nunca fumantes e com metástases ao diagnóstico. Não houve associação dos rearranjos do gene *ALK* identificados com a proporção de ancestralidade dos pacientes. Não houve associação da presença de rearranjos do gene *ALK* com o desfecho clínico dos pacientes com CPNPC.

Dessa forma, nossos resultados contribuem para uma maior caracterização de rearranjos oncogênicos mais incidentes na população de pacientes CPNPC Brasileiros atendidos no Hospital de Câncer de Barretos, auxiliando na escolha do melhor manejo clínico do paciente e consequentemente na indicação de terapias direcionadas aos rearranjos gênicos *ALK/RET/ROS1*.

REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. **CA Cancer J Clin**. 2018.
2. *Incidência do Câncer no Brasil*. [Internet] Rio de Janeiro: INCA; 2018 [cited Jun 12]; Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>.
3. de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF. *The epidemiology of lung cancer*. **Transl Lung Cancer Res**. 2018;7(3):220-33.
4. Ettinger DS, Aisner DL, Wood DE, Akerley W, Bauman J, Chang JY, et al. *NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2018*. **J Natl Compr Canc Netw**. 2018;16(7):807-21.
5. Zhang Y, Li X, Segars WP, Samei E. *Comparison of patient specific dose metrics between chest radiography, tomosynthesis, and CT for adult patients of wide ranging body habitus*. **Med Phys**. 2014;41(2):023901.
6. Gallamini A, Zwarthoed C, Borra A. *Positron Emission Tomography (PET) in Oncology*. **Cancers (Basel)**. 2014;6(4):1821-89.
7. Rami-Porta R, Asamura H, Travis WD, Rusch VW. *Lung cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual*. **CA Cancer J Clin**. 2017;67(2):138-55.
8. Su C, Zhou F, Shen J, Zhao J, O'Brien M. *Treatment of elderly patients or patients who are performance status 2 (PS2) with advanced Non-Small Cell Lung Cancer without epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations and anaplastic lymphoma kinase (ALK) translocations - Still a daily challenge*. **Eur J Cancer**. 2017;83:266-78.
9. Finkelstein DM, Ettinger DS, Ruckdeschel JC. *Long-term survivors in metastatic non-small-cell lung cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group Study*. **J Clin Oncol**. 1986;4(5):702-9.
10. Leal LF, de Paula FE, De Marchi P, de Souza Viana L, Pinto GDJ, Carlos CD, et al. *Mutational profile of Brazilian lung adenocarcinoma unveils association of EGFR mutations with high Asian ancestry and independent prognostic role of KRAS mutations*. **Sci Rep**. 2019;9(1):3209.
11. Howington JA, Blum MG, Chang AC, Balekian AA, Murthy SC. *Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. **Chest**. 2013;143(5 Suppl):e278S-e313S.
12. Brunelli A, Kim AW, Berger KI, Addrizzo-Harris DJ. *Physiologic evaluation of the patient with lung cancer being considered for resectional surgery: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd*

ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. **Chest**. 2013;143(5 Suppl):e166S-e90S.

13. Azzoli CG, Temin S, Aliff T, Baker S, Jr., Brahmer J, Johnson DH, et al. 2011 Focused Update of 2009 American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer. **J Clin Oncol**. 2011;29(28):3825-31.

14. Azzoli CG, Baker S, Jr., Temin S, Pao W, Aliff T, Brahmer J, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol**. 2009;27(36):6251-66.

15. Halliday PR, Blakely CM, Bivona TG. *Emerging Targeted Therapies for the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer*. **Curr Oncol Rep**. 2019;21(3):21.

16. Gandhi L, Rodriguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. *Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer*. **N Engl J Med**. 2018;378(22):2078-92.

17. Testa U, Castelli G, Pelosi E. *Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells*. **Cancers (Basel)**. 2018;10(8).

18. medical TACS. *Small Cell Lung Cancer*. [Internet] 2016 [updated 2019 October 01; cited 2019 November 10]; Available from: <https://www.cancer.org/content/cancer/en/cancer/lung-cancer/about/what-is.html>.

19. Bernhardt EB, Jalal SI. *Small Cell Lung Cancer*. **Cancer Treat Res**. 2016;170:301-22.

20. van Meerbeeck JP, Fennell DA, De Ruysscher DK. *Small-cell lung cancer*. **Lancet**. 2011;378(9804):1741-55.

21. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. *The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification*. **J Thorac Oncol**. 2015;10(9):1243-60.

22. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. *Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart*. **J Thorac Oncol**. 2015;10(9):1240-2.

23. Rosell R, Karachaliou N. *Large-scale screening for somatic mutations in lung cancer*. **Lancet**. 2016;387(10026):1354-6.

24. Shtivelman E, Hensing T, Simon GR, Dennis PA, Otterson GA, Bueno R, et al. *Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer*. **Oncotarget**. 2014;5(6):1392-433.

25. Skoulidis F, Heymach JV. *Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy.* **Nat Rev Cancer.** 2019;19(9):495-509.
26. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Jr., Wu YL, et al. *Lung cancer: current therapies and new targeted treatments.* **Lancet.** 2017;389(10066):299-311.
27. Hensing T, Chawla A, Batra R, Salgia R. *A personalized treatment for lung cancer: molecular pathways, targeted therapies, and genomic characterization.* **Adv Exp Med Biol.** 2014;799:85-117.
28. Suda K, Mitsudomi T. *Role of EGFR mutations in lung cancers: prognosis and tumor chemosensitivity.* **Arch Toxicol.** 2015;89(8):1227-40.
29. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W, et al. *Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers.* **Clin Cancer Res.** 2013;19(8):2240-7.
30. Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, Chang AC, Cheney RT, Chirieac LR, et al. *Non-small cell lung cancer.* **J Natl Compr Canc Netw.** 2012;10(10):1236-71.
31. Zenker M, Lehmann K, Schulz AL, Barth H, Hansmann D, Koenig R, et al. *Expansion of the genotypic and phenotypic spectrum in patients with KRAS germline mutations.* **J Med Genet.** 2007;44(2):131-5.
32. Zhu YC, Lin XP, Li XF, Wu LX, Chen HF, Wang WX, et al. *Concurrent ROS1 gene rearrangement and KRAS mutation in lung adenocarcinoma: A case report and literature review.* **Thorac Cancer.** 2018;9(1):159-63.
33. Shepherd FA, Domerg C, Hainaut P, Janne PA, Pignon JP, Graziano S, et al. *Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy.* **J Clin Oncol.** 2013;31(17):2173-81.
34. Nacu S, Yuan W, Kan Z, Bhatt D, Rivers CS, Stinson J, et al. *Deep RNA sequencing analysis of readthrough gene fusions in human prostate adenocarcinoma and reference samples.* **BMC Med Genomics.** 2011;4:11.
35. Tuna M, Amos CI, Mills GB. *Molecular mechanisms and pathobiology of oncogenic fusion transcripts in epithelial tumors.* **Oncotarget.** 2019;10(21):2095-111.
36. Yoshihara K, Wang Q, Torres-Garcia W, Zheng S, Vegesna R, Kim H, et al. *The landscape and therapeutic relevance of cancer-associated transcript fusions.* **Oncogene.** 2015;34(37):4845-54.

37. Santosham M, Foster S, Reid R, Bertrando R, Yolken R, Burns B, et al. *Role of soy-based, lactose-free formula during treatment of acute diarrhea.* **Pediatrics.** 1985;76(2):292-8.
38. Evangelista AF, Zanon MF, Carloni AC, de Paula FE, Morini MA, Ferreira-Neto M, et al. *Detection of ALK fusion transcripts in FFPE lung cancer samples by NanoString technology.* **BMC Pulm Med.** 2017;17(1):86.
39. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, et al. *KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma.* **Nat Med.** 2012;18(3):375-7.
40. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. *Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children.* **N Engl J Med.** 2018;378(8):731-9.
41. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. *NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types.* **ESMO Open.** 2016;1(2):e000023.
42. Kumar-Sinha C, Kalyana-Sundaram S, Chinnaiyan AM. *Landscape of gene fusions in epithelial cancers: seq and ye shall find.* **Genome Med.** 2015;7:129.
43. Duployez N, Nibourel O, Marceau-Renaut A, Willekens C, Helevaut N, Caillaud A, et al. *Minimal residual disease monitoring in t(8;21) acute myeloid leukemia based on RUNX1-RUNX1T1 fusion quantification on genomic DNA.* **Am J Hematol.** 2014;89(6):610-5.
44. Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, Zimmermann M, Alonzo TA, Auvrignon A, et al. *Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study.* **Blood.** 2009;114(12):2489-96.
45. Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. *Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease.* **Biochem J.** 2009;420(3):345-61.
46. Grande E, Bolos MV, Arriola E. *Targeting oncogenic ALK: a promising strategy for cancer treatment.* **Mol Cancer Ther.** 2011;10(4):569-79.
47. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. *Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma.* **Science.** 1994;263(5151):1281-4.
48. Franco R, Rocco G, Marino FZ, Pirozzi G, Normanno N, Morabito A, et al. *Anaplastic lymphoma kinase: a glimmer of hope in lung cancer treatment?* **Expert Rev Anticancer Ther.** 2013;13(4):407-20.

49. Barreca A, Lasorsa E, Riera L, Machiorlatti R, Piva R, Ponzoni M, et al. *Anaplastic lymphoma kinase in human cancer*. **J Mol Endocrinol**. 2011;47(1):R11-23.
50. Holla VR, Elamin YY, Bailey AM, Johnson AM, Litzenburger BC, Khotskaya YB, et al. *ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy*. **Cold Spring Harb Mol Case Stud**. 2017;3(1):a001115.
51. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. *Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer*. **Nature**. 2007;448(7153):561-6.
52. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. *Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population*. **Clin Cancer Res**. 2009;15(16):5216-23.
53. Won JK, Keam B, Koh J, Cho HJ, Jeon YK, Kim TM, et al. *Concomitant ALK translocation and EGFR mutation in lung cancer: a comparison of direct sequencing and sensitive assays and the impact on responsiveness to tyrosine kinase inhibitor*. **Ann Oncol**. 2015;26(2):348-54.
54. Chiari R, Duranti S, Ludovini V, Bellezza G, Pireddu A, Minotti V, et al. *Long-term response to gefitinib and crizotinib in lung adenocarcinoma harboring both epidermal growth factor receptor mutation and EML4-ALK fusion gene*. **J Clin Oncol**. 2014;32(9):e30-2.
55. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. *First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer*. **N Engl J Med**. 2014;371(23):2167-77.
56. Ye M, Zhang X, Li N, Zhang Y, Jing P, Chang N, et al. *ALK and ROS1 as targeted therapy paradigms and clinical implications to overcome crizotinib resistance*. **Oncotarget**. 2016;7(11):12289-304.
57. McKeage K. *Alectinib: a review of its use in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancer*. **Drugs**. 2015;75(1):75-82.
58. Davies J, Martinec M, Delmar P, Coudert M, Bordogna W, Golding S, et al. *Comparative effectiveness from a single-arm trial and real-world data: alectinib versus ceritinib*. **J Comp Eff Res**. 2018;7(9):855-65.
59. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ, et al. *Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer*. **N Engl J Med**. 2013;368(25):2385-94.
60. Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Sugimura T, Tucker J, et al. *Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2*. **Oncogene**. 1989;4(12):1519-21.

61. Ibanez CF. *Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase*. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2013;5(2).
62. Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, et al. *PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas*. **Cell**. 1990;60(4):557-63.
63. Li AY, McCusker MG, Russo A, Scilla KA, Gittens A, Arensmeyer K, et al. *RET fusions in solid tumors*. **Cancer Treat Rev**. 2019;81:101911.
64. Kato S, Subbiah V, Marchlik E, Elkin SK, Carter JL, Kurzrock R. *RET Aberrations in Diverse Cancers: Next-Generation Sequencing of 4,871 Patients*. **Clin Cancer Res**. 2017;23(8):1988-97.
65. Ju YS, Lee WC, Shin JY, Lee S, Bleazard T, Won JK, et al. *A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing*. **Genome Res**. 2012;22(3):436-45.
66. Wang R, Hu H, Pan Y, Li Y, Ye T, Li C, et al. *RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer*. **J Clin Oncol**. 2012;30(35):4352-9.
67. Drilon A, Wang L, Hasanovic A, Suehara Y, Lipson D, Stephens P, et al. *Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas*. **Cancer Discov**. 2013;3(6):630-5.
68. Chao BH, Briesewitz R, Villalona-Calero MA. *RET fusion genes in non-small-cell lung cancer*. **J Clin Oncol**. 2012;30(35):4439-41.
69. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. *RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer*. **Nat Med**. 2012;18(3):378-81.
70. Mendoza L. *Clinical development of RET inhibitors in RET-rearranged non-small cell lung cancer: Update*. **Oncol Rev**. 2018;12(2):352.
71. Subbiah V, Velcheti V, Tuch BB, Ebata K, Busaidy NL, Cabanillas ME, et al. *Selective RET kinase inhibition for patients with RET-altered cancers*. **Ann Oncol**. 2018;29(8):1869-76.
72. Guo R, Schreyer M, Chang JC, Rothenberg SM, Henry D, Cotzia P, et al. *Response to Selective RET Inhibition With LOXO-292 in a Patient With RET Fusion-Positive Lung Cancer With Leptomeningeal Metastases*. **JCO Precis Oncol**. 2019;3.
73. Davies KD, Doebele RC. *Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer*. **Clin Cancer Res**. 2013;19(15):4040-5.

74. Gu TL, Deng X, Huang F, Tucker M, Crosby K, Rimkunas V, et al. *Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma*. **PLoS One**. 2011;6(1):e15640.
75. Birch AH, Arcand SL, Oros KK, Rahimi K, Watters AK, Provencher D, et al. *Chromosome 3 anomalies investigated by genome wide SNP analysis of benign, low malignant potential and low grade ovarian serous tumours*. **PLoS One**. 2011;6(12):e28250.
76. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. *Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer*. **N Engl J Med**. 2014;371(21):1963-71.
77. Zhu Q, Zhan P, Zhang X, Lv T, Song Y. *Clinicopathologic characteristics of patients with ROS1 fusion gene in non-small cell lung cancer: a meta-analysis*. **Transl Lung Cancer Res**. 2015;4(3):300-9.
78. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. *ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers*. **J Clin Oncol**. 2012;30(8):863-70.
79. Mazieres J, Zalcman G, Crino L, Biondani P, Barlesi F, Filleron T, et al. *Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort*. **J Clin Oncol**. 2015;33(9):992-9.
80. Yuan J, Hu Z, Mahal BA, Zhao SD, Kensler KH, Pi J, et al. *Integrated Analysis of Genetic Ancestry and Genomic Alterations across Cancers*. **Cancer Cell**. 2018;34(4):549-60 e9.
81. Calvayrac O, Pradines A, Pons E, Mazieres J, Guibert N. *Molecular biomarkers for lung adenocarcinoma*. **Eur Respir J**. 2017;49(4).
82. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, et al. *Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers*. **J Natl Cancer Inst**. 2005;97(5):339-46.
83. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, et al. *Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update*. **J Clin Oncol**. 2018;36(9):911-9.
84. Oliveira A, Silva A, Alves M, Cronemberger E, Carneiro BA, Melo JC, et al. *Molecular profile of non-small cell lung cancer in northeastern Brazil*. **J Bras Pneumol**. 2019;45(3):e20180181.

85. Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA, et al. *Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis.* **Lancet Oncol.** 2011;12(11):1004-12.
86. Wagle PB, Jambhekar NA, Kumar R, Prabhash K, Pramesh CS, Desai SB, et al. *A comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization assay to detect anaplastic lymphoma kinase status in lung adenocarcinoma cases: A search for a testing algorithm.* **Indian J Cancer.** 2017;54(1):148-54.
87. Niu X, Chuang JC, Berry GJ, Wakelee HA. *Anaplastic Lymphoma Kinase Testing: IHC vs. FISH vs. NGS.* **Curr Treat Options Oncol.** 2017;18(12):71.
88. Rogers TM, Arnau GM, Ryland GL, Huang S, Lira ME, Emmanuel Y, et al. *Multiplexed transcriptome analysis to detect ALK, ROS1 and RET rearrangements in lung cancer.* **Sci Rep.** 2017;7:42259.
89. Hout DR, Schweitzer BL, Lawrence K, Morris SW, Tucker T, Mazzola R, et al. *Performance of a RT-PCR Assay in Comparison to FISH and Immunohistochemistry for the Detection of ALK in Non-Small Cell Lung Cancer.* **Cancers (Basel).** 2017;9(8).
90. Cruz-Rico G, Aviles-Salas A, Segura-Gonzalez M, Espinosa-Garcia AM, Ramirez-Tirado LA, Morales-Oyarvide V, et al. *Diagnosis of EML4-ALK Translocation With FISH, Immunohistochemistry, and Real-time Polymerase Chain Reaction in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer.* **Am J Clin Oncol.** 2017;40(6):631-8.
91. Cruz-Rico G, Aviles-Salas A, Segura-Gonzalez M, Espinosa-Garcia AM, Ramirez-Tirado LA, Morales-Oyarvide V, et al. *Diagnosis of EML4-ALK Translocation With FISH, Immunohistochemistry, and Real-time Polymerase Chain Reaction in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer.* **Am J Clin Oncol.** 2015.
92. Velizheva NP, Rechsteiner MP, Valtcheva N, Freiburger SN, Wong CE, Vrugt B, et al. *Targeted next-generation-sequencing for reliable detection of targetable rearrangements in lung adenocarcinoma-a single center retrospective study.* **Pathol Res Pract.** 2018;214(4):572-8.
93. Abel HJ, Al-Kateb H, Cottrell CE, Bredemeyer AJ, Pritchard CC, Grossmann AH, et al. *Detection of gene rearrangements in targeted clinical next-generation sequencing.* **J Mol Diagn.** 2014;16(4):405-17.
94. von Laffert M, Stenzinger A, Hummel M, Weichert W, Lenze D, Warth A, et al. *ALK-FISH borderline cases in non-small cell lung cancer: Implications for diagnostics and clinical decision making.* **Lung Cancer.** 2015;90(3):465-71.

95. Martin V, Bernasconi B, Merlo E, Balzarini P, Vermi W, Riva A, et al. *ALK testing in lung adenocarcinoma: technical aspects to improve FISH evaluation in daily practice.* **J Thorac Oncol.** 2015;10(4):595-602.
96. Lira ME, Choi YL, Lim SM, Deng S, Huang D, Ozeck M, et al. *A single-tube multiplexed assay for detecting ALK, ROS1, and RET fusions in lung cancer.* **J Mol Diagn.** 2014;16(2):229-43.
97. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. *Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs.* **Nat Biotechnol.** 2008;26(3):317-25.
98. Ali G, Bruno R, Savino M, Giannini R, Pelliccioni S, Menghi M, et al. *Analysis of Fusion Genes by NanoString System: A Role in Lung Cytology?* **Arch Pathol Lab Med.** 2018;142(4):480-9.
99. Paul A. Harris RT, Robert Thielke, Jonathon Payne, Nathaniel Gonzalez, Jose G. Conde. *Research electronic data capture (REDCap) - A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support.* **J Biomed Inform.** 2009;42(2):377-81.
100. Phelps RM, Johnson BE, Ihde DC, Gazdar AF, Carbone DP, McClintock PR, et al. *NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line data base.* **J Cell Biochem Suppl.** 1996;24:32-91.
101. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. *Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors.* **J Natl Cancer Inst.** 1977;58(2):209-14.
102. Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, dos Santos SE, Amorim A, et al. *Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing.* **PLoS One.** 2012;7(1):e29684.
103. Campanella NC, Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Viana D, Palmero EI, Pereira R, et al. *Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers.* **Eur J Hum Genet.** 2014;22(7):875-80.
104. Lira ME, Kim TM, Huang D, Deng S, Koh Y, Jang B, et al. *Multiplexed gene expression and fusion transcript analysis to detect ALK fusions in lung cancer.* **J Mol Diagn.** 2013;15(1):51-61.
105. Hong S, Fang W, Hu Z, Zhou T, Yan Y, Qin T, et al. *A large-scale cross-sectional study of ALK rearrangements and EGFR mutations in non-small-cell lung cancer in Chinese Han population.* **Sci Rep.** 2014;4:7268.
106. Arrieta O, Cardona AF, Bramuglia G, Cruz-Rico G, Corrales L, Martin C, et al. *Molecular Epidemiology of ALK Rearrangements in Advanced Lung Adenocarcinoma in Latin America.* **Oncology.** 2018:1-10.

107. Yamaguchi N, Vanderlaan PA, Folch E, Boucher DH, Canepa HM, Kent MS, et al. *Smoking status and self-reported race affect the frequency of clinically relevant oncogenic alterations in non-small-cell lung cancers at a United States-based academic medical practice.* **Lung Cancer.** 2013;82(1):31-7.
108. Steuer CE, Behera M, Berry L, Kim S, Rossi M, Sica G, et al. *Role of race in oncogenic driver prevalence and outcomes in lung adenocarcinoma: Results from the Lung Cancer Mutation Consortium.* **Cancer.** 2016;122(5):766-72.
109. Araujo LH, Baldotto C, Castro G, Jr., Katz A, Ferreira CG, Mathias C, et al. *Lung cancer in Brazil.* **J Bras Pneumol.** 2018;44(1):55-64.
110. Machado-Rugolo J, Fabro AT, Ascheri D, Farhat C, Ab'Saber AM, de Sa VK, et al. *Usefulness of complementary next-generation sequencing and quantitative immunohistochemistry panels for predicting brain metastases and selecting treatment outcomes of non-small cell lung cancer.* **Hum Pathol.** 2019;83:177-91.
111. Lopes LF, Bacchi CE. *Anaplastic lymphoma kinase gene rearrangement in non-small-cell lung cancer in a Brazilian population.* **Clinics (Sao Paulo).** 2012;67(7):845-7.
112. Andreis TF, Correa BS, Vianna FS, De-Paris F, Siebert M, Leistner-Segal S, et al. *Analysis of Predictive Biomarkers in Patients With Lung Adenocarcinoma From Southern Brazil Reveals a Distinct Profile From Other Regions of the Country.* **J Glob Oncol.** 2019;5:1-9.
113. Polato CPB, Bonfante GMdS, Andrade EIG, Acurcio FdA, Machado CJ, Cherchiglia ML. *Análise de sobrevida em pacientes com câncer de pulmão tratados no Sistema Único de Saúde no Brasil entre 2002 e 2003.* **Cadernos Saúde Coletiva.** 2013;21:173-81.
114. Ross PJ, Ashley S, Norton A, Priest K, Waters JS, Eisen T, et al. *Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers?* **Br J Cancer.** 2004;90(10):1905-11.
115. Lau SKM, Gannavarapu BS, Carter K, Gao A, Ahn C, Meyer JJ, et al. *Impact of Socioeconomic Status on Pretreatment Weight Loss and Survival in Non-Small-Cell Lung Cancer.* **J Oncol Pract.** 2018;14(4):e211-e20.
116. Levy MA, Lovly CM, Pao W. *Translating genomic information into clinical medicine: lung cancer as a paradigm.* **Genome Res.** 2012;22(11):2101-8.
117. Davies KD, Le AT, Theodoro MF, Skokan MC, Aisner DL, Berge EM, et al. *Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer.* **Clin Cancer Res.** 2012;18(17):4570-9.
118. Ross JS, Ali SM, Fasan O, Block J, Pal S, Elvin JA, et al. *ALK Fusions in a Wide Variety of Tumor Types Respond to Anti-ALK Targeted Therapy.* **Oncologist.** 2017;22(12):1444-50.

119. Warth A, Muley T, Dienemann H, Goeppert B, Stenzinger A, Schnabel PA, et al. *ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer: clinicopathological analysis of 1478 cases. Histopathology.* 2014;65(2):187-94.
120. Sholl LM, Sun H, Butaney M, Zhang C, Lee C, Janne PA, et al. *ROS1 immunohistochemistry for detection of ROS1-rearranged lung adenocarcinomas. Am J Surg Pathol.* 2013;37(9):1441-9.
121. Doval D, Prabhash K, Patil S, Chaturvedi H, Goswami C, Vaid A, et al. *Clinical and epidemiological study of EGFR mutations and EML4-ALK fusion genes among Indian patients with adenocarcinoma of the lung. Onco Targets Ther.* 2015;8:117-23.
122. Gainor JF, Varghese AM, Ou SH, Kabraji S, Awad MM, Katayama R, et al. *ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res.* 2013;19(15):4273-81.
123. Dugay F, Llamas-Gutierrez F, Gournay M, Medane S, Mazet F, Chiforeanu DC, et al. *Clinicopathological characteristics of ROS1- and RET-rearranged NSCLC in caucasian patients: Data from a cohort of 713 non-squamous NSCLC lacking KRAS/EGFR/HER2/BRAF/PIK3CA/ALK alterations. Oncotarget.* 2017;8(32):53336-51.
124. Yoshida T, Oya Y, Tanaka K, Shimizu J, Horio Y, Kuroda H, et al. *Differential Crizotinib Response Duration Among ALK Fusion Variants in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol.* 2016;34(28):3383-9.
125. Li Y, Zhang T, Zhang J, Li W, Yuan P, Xing P, et al. *Response to crizotinib in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancers with different ALK-fusion variants. Lung Cancer.* 2018;118:128-33.
126. Heuckmann JM, Balke-Want H, Malchers F, Peifer M, Sos ML, Koker M, et al. *Differential protein stability and ALK inhibitor sensitivity of EML4-ALK fusion variants. Clin Cancer Res.* 2012;18(17):4682-90.
127. Fan L, Feng Y, Wan H, Shi G, Niu W. *Clinicopathological and demographical characteristics of non-small cell lung cancer patients with ALK rearrangements: a systematic review and meta-analysis. PLoS One.* 2014;9(6):e100866.
128. Camidge DR, Kono SA, Flacco A, Tan AC, Doebele RC, Zhou Q, et al. *Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. Clin Cancer Res.* 2010;16(22):5581-90.

129. Shinmura K, Kageyama S, Tao H, Bunai T, Suzuki M, Kamo T, et al. *EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas.* **Lung Cancer.** 2008;61(2):163-9.
130. Kim HR, Shim HS, Chung JH, Lee YJ, Hong YK, Rha SY, et al. *Distinct clinical features and outcomes in never-smokers with nonsmall cell lung cancer who harbor EGFR or KRAS mutations or ALK rearrangement.* **Cancer.** 2012;118(3):729-39.
131. Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K, Tsuchihara K, Matsumoto S, Yoh K, et al. *Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer.* **Transl Lung Cancer Res.** 2015;4(2):156-64.
132. Ferrara R, Auger N, Auclin E, Besse B. *Clinical and Translational Implications of RET Rearrangements in Non-Small Cell Lung Cancer.* **J Thorac Oncol.** 2018;13(1):27-45.
133. Drilon A OG, Wirth L, et al. *A phase 1/2 trial of LOXO-292 in patients with RET fusion-positive lung cancers.* In: **IASLC 2019 World Conference on Lung Cancer hosted by the International Association for the Study of Lung Cancer**; Barcelona, Spain; 2019. September 9, 2019.

ANEXOS

Anexo A – Ficha de Coleta

Análise da frequência de mutações do gene BRAF e associação com as características clinicopatológicas de pacientes com adenocarcinoma de pulmão			
Sociodemográficos			
1	ID Identificação do paciente no estudo	1	
2	PES ID Código encontrado no SISONCO para fazer ligação entre as variáveis	2	
3	ID NAP (fichas de coleta) Mantivemos por causa das fichas de coleta	3	
4	Registro Hospitalar	4	
5	RH Barretos (SISOCNO)	5	
Dados sociodemográficos			
6	Nome completo	6	
7	Iniciais do nome	7	
8	Data de nascimento	8	
9	idade ao diagnostico round(datediff ([dt_nasc], [dt_diagc34_histol], "y", "dmy",true),2)	9	
10	Data do preenchimento da ficha	10	
11	Cidade de Naturalidade	11	
12	Nacionalidade	12	
13	Naturalidade de Procedência 1, AC 2, AL 3, AM 4, AP 5, BA 6, CE 7, DF 8, ES 9, GO 10, MA 11, MG 12, MS 13, MT 14, PA 15, PB 16, PE 17, PI 18, PR 19, RJ 20, RN 21, RO 22, RR 23, RS 24, SC 25, SE 26, SP 27, TO 28, ESTRANGEIRO 99, IGNORADO	13	
14	Naturalidade agrupada conforme Regiões Brasileira	14	

	1, SUDESTE 2, SUL 3, CENTRO-OESTE 4, NORTE 5, NORDESTE 6, ESTRANGEIRO 99, IGNORADO		
1 5	Cidade de Procedência	15	
1 6	Estado de Procedência 1, AC 2, AL 3, AM 4, AP 5, BA 6, CE 7, DF 8, ES 9, GO 10, MA 11, MG 12, MS 13, MT 14, PA 15, PB 16, PE 17, PI 18, PR 19, RJ 20, RN 21, RO 22, RR 23, RS 24, SC 25, SE 26, SP 27, TO 28, ESTRANGEIRO 99, IGNORADO	16	
1 7	Estado (SISONCO)	17	
1 8	Procedência agrupada conforme Regiões Brasileira 1, SUDESTE 2, SUL 3, CENTRO-OESTE 4, NORTE 5, NORDESTE 6, ESTRANGEIRO 99, IGNORADO	18	
1 9	Gênero 1, Masculino 2, Feminino	19	
2 0	Sexo (SISONCO) 0, Feminino 1, Masculino	20	
2 1	Maior Nível Educação 1,Analfabeto/Fund. Incompl. 2, ≥ Fund. Compl 99,Ignorado	21	
2 2	Cor/raça (IBGE) 1,Branca 2,Parda 3,Negra 4,Amarela 5,Indigena 99,Ignorado	22	
2 3	Cor/raça (2 cat) 0, Nao Branca 1, Branca 99, Ignorado	23	
2 4	Cor (SISONCO) 0, Indefinido 1, Branco 2, Negro 3, Amarelo 4, Pardo 5, Indigena 6, Cafuso	24	
2 5	Grau de instrução (SISONCO) 0, Indefinido 1, Analfabeto 2, Primeiro grau incompleto 3, Primeiro grau completo 4, Segundo grau incompleto	25	

	5, Segundo grau completo 6, Superior incompleto 7, Superior completo 8, Pos graduacao incompleto 9, Pos graduacao completo		
26	Ocupação (SISONCO)	26	
27	Etilismo 0,Nunca 1,ativo 2,ex-etilista 99, Ignorado	27	
28	Tabagismo 0,Nunca 1,ativo 2,passado 99, Ignorado	28	
29	Ficha de coleta preenchida digitalizada Campo para upload	29	
Dados clínicos			
Admissão			
30	Peso a admissão (Kg)	30	
31	Altura a admissão (cm)	31	
32	PS ECOG admissão (0-4) 0, 0 1, 1 2, 2 3, 3 4, 4 99, Ignorado	32	
33	Sínd. Paraneó admissão 0, Nao 1, Sim 99, Ignorado	33	
34	Sínd. de veia cava superior 0, Nao 1, Sim 99, Ignorado	34	
35	Tumor de Pancoast 0, Nao 1, Sim 99, Ignorado	35	
36	Emagrecimento <6m 0, Nao 1,sim<10% 2,sim>10% 99,Ignorado	36	
37	Qual o primeiro diagnóstico oncológico conforme o CID.C10	37	

38	Data do diagnóstico histológico do C34	38	
39	Tipo histológico 1, Adenocarcinoma 2, Escamoso 3, Adenoescamoso 4, Outro	39	
40	Outro tipo histológico Descrever	40	
41	Subtipo histológico 1, Acinar 2, Mucinoso 3, Lepidic 4, Papilary 5, Solid 6, Adenocarcinoma NOS	41	
42	Grau diferenciação 1,G1 2,G2 3,G3 4,G4 99, Ignorado	42	
43	Realizou todos exames para estadiamento? 0, Nao 1, Sim 99, Ignorado	43	
Estadiamento			
44	Estadio T 0, Tx 1, T0 2, Tis 3, T1a 4, T1b 5, T2a 6, T2b 7, T3 8, T4 99, Ignorado	44	
45	Estadio N 0, Nx 1, N0 2, N1 3, N2 4, N3 99, Ignorado	45	
46	Estadio M 0, Mx 1, M0 2, M1a 3, M1b 99, Ignorado	46	
47	Agrupamento AJCC I II III IV 0, 0 1, I 2, II 3, III 4, IV 99, Ignorado	47	
48	Agrupamento AJCC I II III IV 1, 0/I 2, II 3, III 4, IV 99, Ignorado	48	
49	Agrupamento AJCC 2009 0, 0 1, IA 2, IB 3, IIA 4, IIB 5, IIIA 6, IIIB 7, IV 99, Ignorado	49	
Diagnóstico			

50	Metastase ao diagnostico 0, Nao 1, Sim 99, Ignorado	50	
51	Órgãos c/ meta diagnós 0, Nao 1, Orgao unico 2, Multiplos orgaos 99, Ignorado	51	
52	Metástases pulmonares/pleura ao diagnóstico 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	52	
53	Metástases ósseas ao diagnóstico 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	53	
54	Metástases fígado ao diagnóstico 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	54	
55	Metástases linfonodos ao diagnóstico 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	55	
56	Metástases adrenal ao diagnóstico 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	56	
57	Metástases outros sítios ao diagnóstico 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	57	
58	Metástases SNC ao diagnóstico 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	58	
59	Metastase 3 cat 0, Nao 1, SNC 2, Outros 88, Nao se aplica 99, Ignorado	59	
Diagnóstico molecular			
60	Exon EGFR mutado 0, WT 1, 18 2, 19 3, 20 4, 21 99, Ignorado	60	
61	Descrição do tipo de mutação no gene EGFR	61	
62	Codon KRAS mutado 0, WT 1, 12 2, 13 99, Ignorado	62	

63	Descrição do tipo de mutação no gene KRAS	63	
Tratamento inicial			
64	Cirurgia no primário 0, Nao 1,segmentectomia 2, Lobectomia 3, Pneumectomia 99, Ignorado	64	
65	Data da cirurgia	65	
66	Ressecção da metástase 0, Nao 1,R0 2, R1 3, R2 99, Ignorado	66	
67	Data da cirurgia da metástase	67	
68	Radioterapia sítio primário tto inicial 0, Nao 1, Curativo exclusivo 2, Curativa concomitante 3, Adjuvante 4, Neoadjuvante 5, Paliativa 99, Ignorado	68	
69	Data início da radioterapia	69	
70	Data do término da radioterapia	70	
71	Dose da radioterapia para o tto inicial (sítio primário) Em Gy	71	
72	Radioterapia SNC 0, Nao 1, Profilatica 2, Paliativa 99, Ignorado	72	
73	Radioterapia sítio metastático 0, Nao 1, Sim-antialgico 2, Sim-hemostatica 3, Sim-descompressiva 4, Sim-outro motivo 99, Ignorado	73	
74	Intenção do primeiro tratamento 0, Curativo 1, Paliativo 99, Ignorado	74	
75	Modalidade do tratamento inicial	75	

	0, Suporte clinico exclusivo 1, Local exclusivo (Cirurgia +- RxT) 2, Local (Cirur +- RxT) e sistêmico 3, Sistêmico exclusivo (QT ou TKi) 99, Ignorado		
7 6	Intenção da QT convencional no tto inicial 0,Nao 1,Adj 2,Neoadj - cirur 3,Neoadj - RxT/±QT 4,Paliativa 5, Concomitante 99, Ignorado	76	
7 7	Modalidade de tratamento sistêmico inicial 0, Nao 1, QT convencional sem agente alvo 2, TKi 3, MAB±QT 4, NIB±QT 99, Ignorado	77	
7 8	Regime QT tto inicial	78	
7 9	Quimioterapia com platina tto inicial 0, Nao 1,sim: monodroga 2, sim: 2 drogas 3, sim: 3 drogas 99, Ignorado	79	
8 0	Número de ciclos da quimioterapia tto inicial	80	
8 1	Melhor resposta RECIST após QT inicial 0, RC 1,RP 2,DE 3,PD 88,Nao se aplica 99,Ignorado	81	
8 2	Tratamento sistêmico de manutenção 0, Nao 1, Sim 99, Ignorado	82	
TKi (tto inicial)			
8 3	Uso de inibidor de tirosina quinase no tratamento inicial 0,Nao 1,Sim-primeira linha paliativa 2,Sim-manutencao 99, Ignorado	83	
8 4	TKi após falha do tratamento inicial 0, Nao 1, Sim (2ªlinha paliativa) 2, sim: >=terceira linha paliativa 3, Sim (1ªlinha paliativa) 88, Nao se aplica 99, Ignorado	84	
8 5	TKi 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	85	

8 6	TKI EGFR 1, Sim_WT 2, Sim_Mut 3, Nao_WT 4, Nao_Mut 99, Ignorado	86	
8 7	RespostaTKi_dicotomico 3 cat 0, RC/RP 1, DE 2, PD 88, Nao se aplica 99, Ignorado	87	
8 8	RespostaTKi_dicotomico 0, RC/RP/DE 1, PD 88, Nao se aplica 99, Ignorado	88	
8 9	Melhor resposta RECIST após uso TKi inicial 0, RC 1, RP 2, DE 3, PD 88, Nao se aplica 99, Ignorado	89	
9 0	Resposta RECIST após TKi como tto não inicial 0, RC 1, RP 2, DE 3, PD 88, Nao se aplica 99, Ignorado	90	
9 1	Melhor resposta ao TKi independente da linha de tto 0, RC 1, RP 2, DE >= 6 meses 3, DE < 6 meses 4, PD 88, Nao se aplica 99, Ignorado	91	
9 2	Duração TKi primeira linha	92	
9 3	Duração TKi segunda linha	93	
9 4	TKi utilizado no tto inicial 0, Erlotinibe 1, Gefitinibe 2, Inibidor Pan-Her 3, Motesanibe 4, Crizotinibe 88, Nao se aplica 99, Ignorado	94	
9 5	Data de início de TKi	95	
9 6	Data de término do TKi	96	
9 7	Motivo da suspensão do TKi 0, PD 1, Toxicidade 2, Obito 3, Ma-adesao 4, Em uso 88, Nao se aplica 99, Ignorado	97	

MAB (inicial)			
9 8	Uso de MAB 0, Nao 1, Sim 99, Ignorado	98	
9 9	Nome do MAB no tratamento inicial	99	
1 0 0	Data do término do tratamento inicial (QT, Cirur ou RxT)	10 0	
Evolução			
1 0 1	Data da evolução oncológica	10 1	
1 0 2	Evolução oncológica após o tto inicial 0, Ausencia de recidiva ou progressao 1, Recidiva locorregional 2, Recidiva sistematica 3, Recidiva locorregional e sistematica 4, PD locorregional 5, PD sistematica 6, PD locorregional e sistematico 7, Obito 99, Ignorado	10 2	
1 0 3	Sítios metástases a evolução 1, Orgao unico 2, Multiplos orgaos 88, Nao se aplica 99, Ignorado	10 3	
1 0 4	Metástases pulmão/pleura na evolução 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	10 4	
1 0 5	Metástases ósseas na evolução 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	10 5	
1 0 6	Metástases fígado na evolução 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	10 6	
1 0 7	Metástases SNC na evolução 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	10 7	

108	Metástases linfonodos na evolução 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	108	
109	Metástases adrenal na evolução 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	109	
110	Metástases outros sítios na evolução 0, Nao 1, Sim 88, Nao se aplica 99, Ignorado	110	
Segundo tratamento			
111	Intenção do 2º tto 0, Curativo 1, Paliativo 88, Nao se aplica 99, Ignorado	111	
112	Modalidade do segundo tratamento 0, Suporte clinico exclusivo 1, Local exclusivo (Cirurgia +- RxT) 2, Local (Cirur +- RxT) e sistêmico 3, Sistêmico exclusivo (QT ou TKi) 88, Nao se aplica 99, Ignorado	112	
113	Cirurgia no primário 0, Nao 1, segmentectomia 2, Lobectomia 3, Pneumectomia 4, Outro 88, Nao se aplica 99, Ignorado	113	
114	Data da cirurgia	114	
115	Ressecção da metástase 0, Nao 1, R0 2, R1 3, R2 88, Nao se aplica 99, Ignorado	115	
116	Data da cirurgia da metástase	116	
117	Radioterapia sítio primário após falha do tto inicial 0, Nao 1, Curativo exclusivo 2, Curativa concomitante 3, Paliativa 88, Nao se aplica 99, Ignorado	117	
118	Data início da radioterapia sítio primário	118	

1 1 9	Data do término da radioterapia sítio primário	11 9	
1 2 0	Dose da radioterapia para o tto após falha tto inicial (sítio primário) Em Gy	12 0	
1 2 1	Radioterapia sítio metastático após falha do tto inicial 0, Nao 1, sim-antialgico 2, sim-hemostatica 3, sim-descompressiva 88, Nao se aplica 99, Ignorado	12 1	
1 2 2	Modalidade de tratamento sistêmico após falha inicial 0, Nao 1, QT convencional sem agente alvo 2, TKi 3, MAB±QT 88, Nao se aplica 99, Ignorado	12 2	
1 2 3	Quimioterapia com platina 0, Nao 1, sim: monodroga 2, sim: 2 drogas 3, sim: 3 drogas 88, Nao se aplica 99, Ignorado	12 3	
1 2 4	Número de ciclos (primeiro tto após progressão ou recidiva)	12 4	
TKi (tto 2)			
1 2 5	TKi utilizado após falha do tto inicial 0, Erlotinibe 1, Gefitinibe 2, Inibidor Pan-Her 3, Motesanibe 4, Crizotinibe 88, Nao se aplica 99, Ignorado	12 5	
1 2 6	Data de início de TKi tratamento não inicial	12 6	
1 2 7	Data de término do TKi tratamento não inicial	12 7	
1 2 8	Motivo da suspensão do TKi 0, PD 1, Toxicidade 2, Obito 3, Ma-adesao 88, Nao se aplica 99, Ignorado	12 8	
1 2 9	Número de linhas de TKi (incluindo retratamento)	12 9	

MAB (tto 2)			
1 3 0	Usou MAB após falha do tto inicial 0, Nao 1, Sim 99, Ignorado	13 0	
1 3 1	MAB utilizado após falha do tto inicial	13 1	
1 3 2	Número de linhas de tratamento sistêmico paliativa	13 2	
Segundo primário			
1 3 3	Segundo primário 0, Nao 1, Sim 99, Ignorado	13 3	
1 3 4	Localização (CID.C10) do segundo primário	13 4	
1 3 5	Participou de pesquisa clínica 0, Nao 1,Sim - medicam. experimental 2,Sim - nao recebeu droga experimental 99, Ignorado	13 5	
Variáveis de análise			
1 3 6	Número de Identificação	13 6	
1 3 7	ID estudo	13 7	
1 3 8	ID patologia G	13 8	
Análise molecular			
1 3 9	Status dos genes do EGFR (mutado sensibilidade vs resistencia vs não mutado) 0, WT 1, Mutacao de sensibilidade 2, Mutacao de resistencia 88, Nao se aplica 99, Ignorado	13 9	

1 4 0	Validação após COBAS e Novo Sequenciamento - Dados Planilha Flávia abril/2014 0, WT 1, Mutacao Exon 18 2, Mutacao Exon 19 3, Mutacao Exon 20 4, Mutacao Exon 21 5, Teste Inconclusivo 6, Duas mutacoes - Exon 19 e Exon 20 7, Duas mutacoes - Exon 18 e Exon 21 8, Duas mutacoes - Exon 19 e Exon 21 9, Duas mutacoes - Exon 20 e Exon 21 88, Nao se aplica 99, Ignorado	14 0	
1 4 1	Egfr ex18 cat 0, WT 1, p.Gly719Ala 2, p.Gly719Ser 88, Inconclusivo 99, Nao realizado	14 1	
1 4 2	Egfr ex19 cat 0, WT 2, p.Asp761Tyr 3, p.Glu746_Ala750del 4, p.Glu746_Ser752Val 5, p.Glu746_Thr751Ala 6, p.Leu747_Ala750Pro 7, p.Leu747_Pro753Gln 8, p.Leu747_Pro753Ser 9, p.Leu747_Ser752del 10, p.Leu747_Thr751del 11, p.Ser752_Ile759del 88, Nao realizado 99, Nao realizado	14 2	
1 4 3	EGFR_ex 20 0, WT 2, p.Asn771_His773dupAsnProHis 3, p.Asp770_Asn771insTyr 4, p.Asp770_Val774dup 5, p.Gln761_Ala763dup 6, p.Gly810Asp 7, p.His773_Val774dup 8, p.Pro772_His773dup 9, p.Ser768_Asp770dup 10, p.Ser768Ile 11, p.Thr790Met 88, inconclusivo 99, Nao realizado	14 3	
1 4 4	EGFR_ex 21 0, WT 1, p.Ala859Thr 2, p.His850Asp e p.Leu858Arg 3, p.Leu833Val 4, p.Leu858Arg 5, p.Leu858Arg e p.Glu829Gln 6, p.Leu861Gln 7, p.Val834Leu e p.Leu858Arg 88, Inconclusivo 99, Nao realizado	14 4	
1 4 5	Cobas egfr	14 5	
Ancestralidade			
1 4 6	asn	14 6	

1 4 7	asn_cat 0, Low 1, Intermediate 2, High	14 7	
1 4 8	afr	14 8	
1 4 9	afr_cat 0, Low 1, Intermediate 2, High	14 9	
1 5 0	eur	15 0	
1 5 1	eur_cat 0, Low 1, Intermediate 2, High	15 1	
1 5 2	ame	15 2	
1 5 3	ame_cat 0, Low 1, Intermediate 2, High	15 3	
Análise_braf			
Análises BRAF			
1 5 4	ID:	15 4	campo repetido por piping
1 5 5	ID extração	15 5	
1 5 6	RH:	15 6	campo repetido por piping
1 5 7	Status EGFR final:	15 7	campo repetido por piping

1 5 8	EGFR selvagem 0= Não; 1= Sim	15 8	Campo calculado
1 5 9	DNA	15 9	
1 6 0	Tem DNA? 0, Nao 1, Sim	16 0	
1 6 1	Tem amostra bloco? 0, Nao 1, Sim	16 1	
1 6 2	ID bloco	16 2	
1 6 3	Data de extração	16 3	
1 6 4	Concentração nanodrop	16 4	
1 6 5	Concentração Qubit	16 5	
Exon 11			
1 6 6	Data de PCR Exon 11	16 6	
1 6 7	Amplificação Exon 11 0, Nao 1, Sim	16 7	
1 6 8	Sequenciamento Exon 11 0, Nao 1, Sim	16 8	
1 6 9	Eletroferograma Exon 11	16 9	

Exon 15			
1 7 0	Data de PCR Exon 15	17 0	
1 7 1	Amplificação Exon 15 0, Nao 1, Sim	17 1	
1 7 2	Sequenciamento Exon 15 0, Nao 1, Sim	17 2	
1 7 3	Eletroferograma Exon 15	17 3	
Resultado			
1 7 4	Mutação 0, Nao 1, Sim	17 4	
1 7 5	Análise eletroferograma	17 5	
1 7 6	Mutação codon 1, D594 2, N581 3, G466 4, S467 5, V600 6, Outra	17 6	
1 7 7	Varição	17 7	
1 7 8	Outra mutação	17 8	
Análise hoxa9			
Metilação HOXA9			
1 7 9	Análise para HOXA9? 0, Nao 1, Sim	17 9	
1 8 0	Há DNA disponível? 0, Nao 1, Sim	18 0	

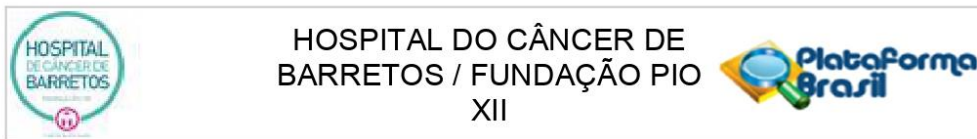
1 8 1	Identificação DNA	18 1	
1 8 2	ID Bloco	18 2	
Experimento			
1 8 3	Quantificação por Qubit Em ng/ μ l	18 3	
1 8 4	Data da conversão de bissulfito	18 4	
1 8 5	Concentração de DNA para conversão de bissulfito Em ng/ μ l	18 5	
1 8 6	Data da ddPCR	18 6	
1 8 7	Lote da conversão de bissulfito mesmo mix	18 7	
1 8 8	Concentração de DNA para ddPCR $x\text{DNA}/\mu\text{l} + y\text{H}_2\text{O} = z$ ng/ μ l	18 8	
1 8 9	Lote de ddPCR mesmo mix	18 9	
Resultado			
1 9 0	Análise da ddPCR mesmo mix	19 0	
1 9 1	Nível de metilação HOXA9	19 1	
Análise ALK/RET/ROS1/ntrk1			

Dados SISONCO			
1 9 2	ID:	19 2	campo repetido por piping
1 9 3	RH:	19 3	campo repetido por piping
1 9 4	Tipo histológico:	19 4	campo repetido por piping
1 9 5	Status EGFR:	19 5	campo repetido por piping
1 9 6	Status KRAS:	19 6	campo repetido por piping
1 9 7	Status EGFR - 2 categorias 0=WT/1=Mutado	19 7	campo calculado
1 9 8	Status KRAS - 2 categorias 0=WT/1=Mutado	19 8	campo calculado
1 9 9	Fez Imunohistoquímica ALK? 0, Nao 1, Sim	19 9	
2 0 0	Resultado 1,ALK positivo 2,ALK Negativo	20 0	
2 0 1	Número do Bloco	20 1	
2 0 2	Fez FISH? 0, Nao 1, Sim	20 2	
2 0 3	Qual alvo? 1,ALK 2,RET 3,ROS1	20 3	

2 0 4	Resultado 0,Negativo 1,Positivo	20 4	
2 0 5	Número do Bloco	20 5	
	Extração RNA		
2 0 6	Material disponível 0, Nao 1, Sim	20 6	
2 0 7	Bloco parafina	20 7	
2 0 8	ID extração RNA	20 8	
2 0 9	Quantificação RNA	20 9	
2 1 0	Quantidade RNA suficiente? 0, Nao 1, Sim	21 0	
Análise NanoString			
2 1 1	Realizado nanostring? 0, Nao 1, Sim	21 1	
2 1 2	Quantidade RNA usada na reação	21 2	
2 1 3	Resultado NanoString 0,Negativo 1,Positivo	21 3	
2 1 4	Se positivo, qual alvo? 1,ALK 2,RET 3,ROS1 4,NTRK1	21 4	

2 1 5	ID Cartucho	21 5	
Dados Validação			
2 1 6	Validação por IHC-ALK? 0, Nao 1, Sim	21 6	
2 1 7	Resultado 0,Negativo 1,Positivo	21 7	
2 1 8	Validação por FISH? 0, Nao 1, Sim	21 8	
2 1 9	Qual Alvo? 1,ALK 2,RET 3,ROS1 4,NTRK1	21 9	
2 2 0	Resultado 0,Negativo 1,Positivo	22 0	
Arquivo rcc			
2 2 1	Upload do arquivo rcc	22 1	
desfecho			
Desfecho			
2 2 2	Data da última informação	22 2	
2 2 3	Status atual 0,Vivo sem doença 1,Vivo com doença 2,Óbito pelo tumor 3,Óbito toxicidade 4,Óbito comorbidade 5,Óbito pós-cirurgia 6,Óbito indetermin 7,Perda seguimento 8, ÓBITO PELO 2º TUMOR PRIMÁRIO 99, IGNORADO	22 3	
2 2 4	Tempo entre diagnóstico e último status (em meses)	22 4	campo calculado

Anexo B – Carta Aprovação CEP



Continuação do Parecer: 2.311.441

toxicidade. No entanto, observou-se diferenças de respostas ao tratamento em certos grupos. Mutações encontradas no gene EGFR em NSCLC, a maioria localizadas nos éxons 18-21, explicam parte destas diferenças. E estas mutações tem sido correlacionadas com a sensibilidade a EGFR- TKIs. Apesar da resposta favorável ao tratamento com TKIs, praticamente metade dos pacientes NSCLC, apresentam recaída com aquisição de resistência, que tem sido caracterizada como eventos moleculares secundários responsáveis pela recidiva do tumor. Variações genéticas em genes envolvido na via de sinalização de EGFR (via / RAF / MAPK / ERK e PI3K/AKT/mTOR), também podem modular a sinalização através destas vias e resultar na variação do desenvolvimento de toxicidade ou na evolução clínica do paciente pós-terapia. Recentemente, rearranjos cromossômicos envolvendo os oncogenes ALK, RET e ROS, foram identificadas como importantes alterações na tumorigênese pulmonar. Além disto, recentemente vem sendo observado também uma clara variação étnica com a relação a frequência das mutações EGFR e nos genes envolvido em sua via de sinalização, mostrando a preocupação que se deve ter com as terapias alvo contra NSCLC em diferentes regiões do mundo, considerando os diferentes subconjuntos clínicos. Portanto o presente projeto tem como objetivo caracterizar a frequência de mutações no oncogene EGFR e em genes relacionados em sua via de sinalização, correlacionando-os com o impacto de sobrevida ao Erlotinib nos pacientes com câncer de pulmão atendidos pelo H.C, validar a análise do status de metilação do resíduo CpG cg05575921 como marcador biológico sanguíneo associado à exposição ao tabaco, analisar o status de metilação do gene HOXA9 e seu papel como fator prognóstico e, por último, comparar métodos de detecção de mutações mais sensíveis, conciliando ao custo benefício para a prática clínica de diagnóstico.

Objetivo da Pesquisa:

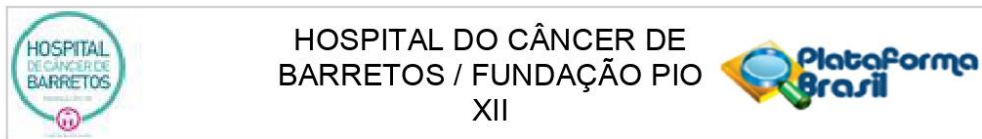
OBJETIVO PRIMÁRIO:

Estudar biomarcadores terapêuticos em paciente com câncer de pulmão do Hospital de Câncer de Barretos (HCB).

OBJETIVO SECUNDÁRIO:

1. Detecção da frequência das mutações EGFR + KRAS (Rotina Padrão Mundial/ Câncer de Pulmão) em pacientes com câncer de pulmão do HCB;
2. Detecção da frequência de alterações moleculares em genes da via de sinalização de EGFR;
3. Comparação de diferentes metodologias de detecção de mutações no gene EGFR;
4. Determinar o perfil de rearranjos de ALK, RET e ROS1 pela metodologia nCounter® / NanoString
5. Avaliar o status de metilacao do gene HOXA9 como biomarcador para risco de recorrência;

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.311.441

6. Determinação de Ancestralidade e seu impacto na frequência de alterações dos genes anteriormente analisados;
7. Validar a análise do status de metilação do resíduo CpG cg05575921 como marcador biológico sanguíneo associado à exposição ao tabaco nas amostras e associar os resultados obtidos com o status de mutação do gene KRAS.
8. Avaliação do impacto das mutações na sobrevida global dos pacientes e ao tratamento com TKIs.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS:

O presente estudo é retrospectivo, não oferecendo qualquer risco aos pacientes envolvidos, salvaguardando o sigilo dos pacientes em todas as etapas do trabalho e o esgotamento do material biológico. No entanto, os pesquisadores se comprometem a tomar as medidas necessárias para manter o sigilo dos dados paciente e também a não esgotar o material biológico.

BENEFÍCIOS:

A partir do conhecimento da característica de nossa população podemos indicar um tratamento personalizado, com provável interferência no prognóstico e/ou resposta à terapia dependendo do genótipo do paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

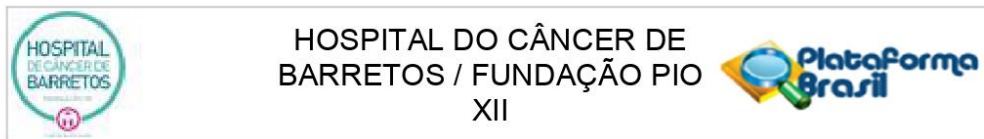
A presente submissão trata-se de E2 ao projeto para aprovação dos seguintes documentos:

- Projeto_DrRui_DiagnosticoMolecular_EmendaFINAL.docx;
- Form_Emenda_Signed.pdf;
- Formulario_EMENDA_Junho2017.docx;
- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_910771_E2.pdf

Neste momento, os pesquisadores submetem uma emenda, com os seguintes objetivos:

1. Analisar o status de metilação do resíduo CpG cg05575921, marcador biológico sanguíneo associado à exposição ao tabaco, por meio do ensaio Smoke Signature™ Assay em amostras de DNA extraídas a partir de buffy coat obtido de sangue periférico dos participantes do presente estudo;
2. Realizar a análise de metilação do gene HOXA9 para todas as amostras da casuística do

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.311.441

presente projeto, a partir das amostras de DNA tumoral previamente extraídas (FFPE). A metilação deste gene tem sido considerada marcador de recorrência em adenocarcinomas de pulmão em estágios iniciais (Robles, A.I., et al. 2015);

3. Inclusão de membros da equipe:

- Dr. Pedro de Marchi, Oncologista Clínico, Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII – Barretos, Brasil.
- Dra. Ana Carolina Carvalho, Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII – Barretos, Brasil, Pesquisadora.
- Dra. Leticia Ferro Leal, Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII – Barretos, Brasil, Pesquisadora.
- Lazaro Novaes, residente em Biomedicina, Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII – Barretos, Brasil.

4. As alterações propostas não alteram os riscos e benefícios do projeto original e assim, não apresentam impacto ético para esta submissão.

5. O presente estudo é retrospectivo, não oferecendo qualquer risco aos pacientes envolvidos, salvaguardando o sigilo dos pacientes em todas as etapas do trabalho e o esgotamento do material biológico. No entanto, os pesquisadores se comprometem a tomar as medidas necessárias para manter o sigilo dos dados paciente e também a não esgotar o material biológico.

Não há benefício direto para o paciente participante do estudo. O potencial benefício do estudo para a sociedade é a melhor caracterização do papel de bactérias na carcinogênese de tumores colorretais, podendo viabilizar a utilização de estratégias de prevenção baseadas no manejo do microbioma intestinal.

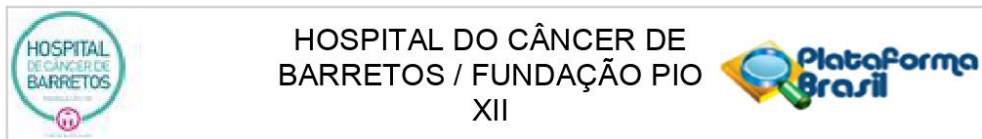
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

Recomendações:

1. No documento "Projeto_DrRui_DiagnosticoMolecular_EmendaFINAL", item "Aspectos éticos/análise de riscos e benefícios", lê-se: Não há benefício direto para o paciente participante do estudo. O potencial benefício do estudo para a sociedade é a melhor caracterização do papel de bactérias na carcinogênese de tumores colorretais, podendo viabilizar a utilização de estratégias

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	CEP: 14.784-400
Bairro: Dr. Paulo Prata	
UF: SP	Município: BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600
	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.311.441

de prevenção baseadas no manejo do microbioma intestinal. Claramente trata-se dos benefícios de outro projeto. Recomenda-se correção.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 630/2012, e:

- Aprovou a emenda ao estudo, submetida em 04/09/2017;

Após análise do(s) documento(s) supracitado(s), o Comitê faz a seguinte recomendação:

- (x) O Estudo deve Continuar;
- () O Estudo dever ser Interrompido;
- () O Estudo está Finalizado;
- () Solicita-se Esclarecimento;

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_910771_E2.pdf	04/09/2017 07:42:35		Aceito
Outros	Formulario_EMENDA_Junho2017.docx	04/09/2017 07:42:10	Leticia Ferro Leal	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Form_Emenda_Signed.pdf	01/09/2017 12:05:58	Leticia Ferro Leal	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_DrRui_DiagnosticoMolecular_EmendaFINAL.docx	24/08/2017 07:01:26	Leticia Ferro Leal	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto pesquisa.pdf	19/07/2012 09:54:03		Aceito
Outros	CEP_DOUTORADO_Carolina_Dias[1].doc	15/07/2012 12:08:33		Aceito
Outros	Declaração de ciência e autorização de estudo.pdf	13/07/2012 14:31:47		Aceito
Outros	Declaração de ciência e autorização	13/07/2012		Aceito

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.311.441

Outros	de estudo 6.pdf	14:31:32		Aceito
Outros	Declaração de ciência e autorização de estudo 5.pdf	13/07/2012 14:31:04		Aceito
Outros	Declaração de ciência e autorização de estudo 4.pdf	13/07/2012 14:30:43		Aceito
Outros	Declaração de ciência e autorização de estudo 3.pdf	13/07/2012 14:30:27		Aceito
Outros	Declaração de ciência e autorização de estudo 2.pdf	13/07/2012 14:30:12		Aceito
Outros	Declaração de ciência e autorização de estudo 1.pdf	13/07/2012 14:29:57		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 03 de Outubro de 2017

Assinado por:
Thiago Buosi Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancelbarretos.com.br



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise do Perfil Molecular do Câncer de Pulmão

Pesquisador: Letícia Ferro Leal

Área Temática:

Versão: 11

CAAE: 55631316.2.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.892.263

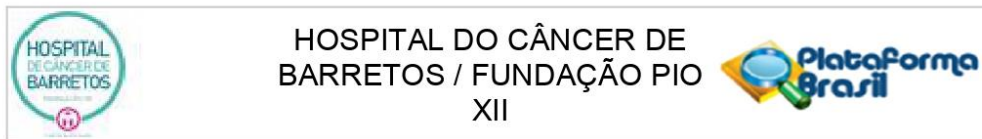
Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1211283_E5.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 30/08/2018)

RESUMO:

O carcinoma do pulmão está entre as principais causas de morte em homens e mulheres por câncer em todo o mundo. A Agência Internacional de Pesquisa de Câncer estima que cerca de 1,8 milhões de novos casos de câncer de pulmão e quase 1,6 milhões de mortes tenham ocorrido em 2012, com projeções ascendentes em algumas partes do mundo. Apenas 15% dos casos de pulmão são diagnosticados em estágios iniciais da doença, quando o tratamento é mais eficiente, e os pacientes apresentam taxa de sobrevivência inferior a 20%. A maioria dos casos de câncer de pulmão (85%) é do tipo carcinoma não pequenas células (NSCLC), que pode ser subdividido em três principais: carcinoma de células escamosas, carcinoma de grandes células e adenocarcinoma. Há também o carcinoma de pulmão de pequenas células (SCLC), de menor frequência, encontrado em grande parte nos brônquios primários e secundários, com alto potencial metastático. O desenvolvimento do câncer de pulmão está associado com extensa inflamação pulmonar e fortemente associado ao tabagismo. Este tipo de neoplasia apresenta perfis mutacionais variados e

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

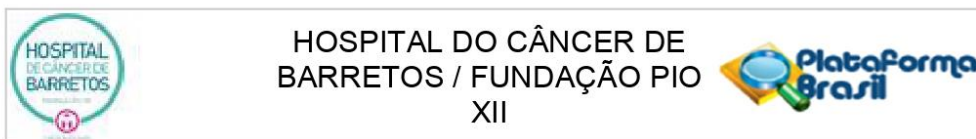
Continuação do Parecer: 2.892.263

complexos, o que torna seu entendimento um desafio de grandes proporções. O presente estudo tem como principal objetivo avaliar uma série retrospectiva de pacientes do Hospital de Câncer de Barretos com diferentes estágios do câncer de pulmão e investigar, nestes pacientes, o perfil molecular das amostras tumorais e identificar alterações associadas a este tipo de tumor tanto em estágios iniciais como em estágios mais avançados e correlacionar estes perfis com as características clínicas dos pacientes. Além disso, pretendemos validar o perfil mutacional observado nos tumores em amostras de biópsia líquida dos pacientes. Os resultados do presente projeto poderão contribuir de forma significativa para elucidação de mecanismos envolvidos na tumorigênese pulmonar, bem como na identificação de marcadores tumorais que permitam o diagnóstico precoce da doença e também marcadores com possível valor prognóstico.

INTRODUÇÃO:

1. INTRODUÇÃO: O carcinoma do pulmão está entre as principais causas de morte em homens e mulheres por câncer em todo o mundo (1). A Agência Internacional de Pesquisa de Câncer estima que cerca de 1,8 milhões de novos casos de câncer de pulmão e quase 1,6 milhões de mortes tenham ocorrido em 2012, com projeções ascendentes em algumas partes do mundo. (2). Apenas 15% dos casos de pulmão são diagnosticados em estadiamento iniciais da doença, quando o tratamento é mais eficiente. Contudo, a taxa de sobrevivência oscila de 14 a 17% (3, 4). Histologicamente, o câncer de pulmão é dividido em dois principais tipos: o de células pequenas (SCLC, do inglês Small Cell Lung Cancer) e o não pequenas células (NSCLC, do inglês Non Small Cell Lung Cancer) (5). Aproximadamente 80 a 85% dos casos de câncer de pulmão são diagnosticados como sendo do tipo histológico NSCLC, apresentando-se localmente avançados ou com metástase em aproximadamente 70% (1, 5, 6). Podem ainda ser subdivididos em: carcinoma de células escamosas, carcinoma de grandes células e adenocarcinoma. Com base nesta subdivisão, o adenocarcinoma é o tipo histológico mais comum e frequentemente se manifesta na forma de massa periférica com aspectos microscópicos característicos que incluem formação glandular, geralmente com produção de mucina. O carcinoma de células escamosas tem maior correlação com o tabagismo, geralmente surge no hilo ou próximo a ele e os aspectos microscópicos variam desde o fenótipo de neoplasia queratinizante, bem diferenciada, até tumor anaplásico. O carcinoma de grandes células representa, provavelmente, um carcinoma de células escamosas ou adenocarcinoma pouco diferenciado que, em certas ocasiões, pode apresentar elementos histológicos peculiares, como células gigantes e células claras (7). 1.1. Carcinomas não pequenas células do pulmão: Muitos portadores de NSCLC com estádios I e II beneficiam-se de

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.892.263

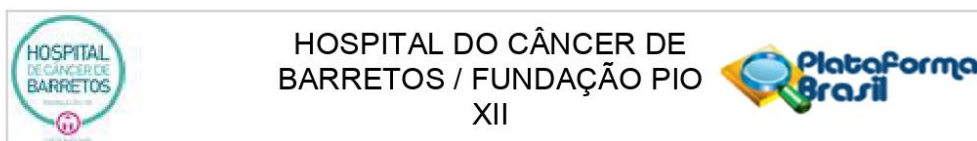
resseção cirúrgica, enquanto pacientes com doença avançada são candidatos aos tratamentos não cirúrgicos (8). A introdução de agentes antiangiogênicos e dos inibidores dos receptores tirosina-quinase, como o do fator de crescimento endotelial (EGFR), melhorou a resposta terapêutica de um grupo selecionado de pacientes com NSCLC. A seleção de pacientes candidatos a estas novas terapias é baseada no reconhecimento de diferentes subtipos histológicos e mutações genéticas que influenciam a biologia tumoral e prediz a eficácia da droga (9). A patogênese do câncer de pulmão é complexa e acredita-se que ocorra devido a uma integração de fatores ambientais e genéticos (10). Embora o tabagismo seja o fator de risco fortemente ligado a esta doença, o câncer de pulmão entre não fumantes é, atualmente, a sétima principal causa de morte por câncer (11). Entretanto, outros fatores relacionados por exemplo, às atividades laborais, como exposição a asbesto, radônio e certos metais (cromo, arsênio, cádmio, sílica e níquel), fumaça de carvão e poluição ambiental, além de hormônios, doença pulmonar prévia e fatores dietéticos, estão associados com a doença e têm recebido maior atenção, principalmente entre os não fumantes (11-13). Sabe-se, entretanto, que i) menos de 20% dos fumantes desenvolvem câncer de pulmão, ii) aproximadamente 25% de não fumantes desenvolvem a neoplasia pulmonar e, iii) o câncer de pulmão é uma importante causa de mortes também entre os não fumantes (12, 13). Isto significa que fatores além daqueles já bem conhecidos, devem existir mais agentes causadores da doença, que poderiam atuar isoladamente ou sinergicamente (12, 14).

1.2. Carcinomas pequenas células do pulmão: O carcinoma pequenas células de pulmão (SCLC) afeta mais de 200.000 pessoas em todo mundo anualmente, correspondendo de 15 a 20% de todos os casos da doença diagnosticados, apresenta taxa de mortalidade muito elevada e, clinicamente, é frequentemente diagnosticado quando há metástase, e pela presença de sinais e sintomas como tosse, falta de ar, dor no peito, fraqueza e perda de peso (15). Portanto, trata-se de um subtipo de câncer de pulmão muito agressivo (16), morfológicamente caracterizado por pequenas células de bordas mal-definidas, citoplasma escasso (17), cromatina nuclear granular e nucléolos ausentes ou discretos (16). Ainda, a necrose é geralmente extensa e há alta atividade mitótica das células neoplásicas (18). Embora exista a classificação histopatológica em NSCLC e SCLC, nem sempre é possível fazer essa distinção porque há características mistas devido ao grande número de células que expressam níveis variáveis de marcadores neuroendócrinos, alveolares e bronquiolares.

1.3. Aspectos moleculares do câncer de pulmão

1.3.1. EGFR receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR, do inglês epidermal growth factor receptor) é uma glicoproteína transmembrana com um domínio intracelular com atividade de tirosina quinase (19). Mutações no gene EGFR levam à ativação do receptor codificado por este gene desencadeando a ativação das vias de sinalização

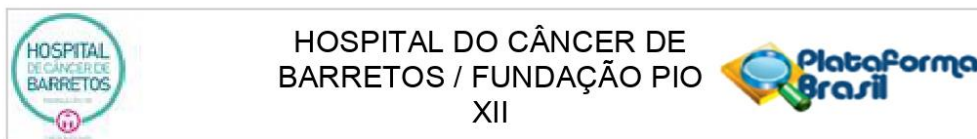
Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	
Bairro: Dr. Paulo Prata	CEP: 14.784-400
UF: SP	Município: BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600
	E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.892.263

subsequentes envolvidas na proliferação, diferenciação e ciclo celular atuando na transformação e progressão neoplásica. Estas mutações ocorrem mais comumente nos exons 19 e 21 e são frequentemente encontradas em alguns subtipos de câncer de pulmão, como os adenocarcinomas e NSCLC. Dentro do subtipo NSCLC, as mutações do gene EGFR estão presentes em aproximadamente 10 a 15% dos tumores, sendo essas mutações mais comuns em pacientes do sexo feminino, pacientes não fumantes e pacientes de etnia asiática, sendo que esta frequência sobe para, aproximadamente, 50% em pacientes de asiáticos (20, 21). A presença de mutações no gene EGFR está associada ao prognóstico dos pacientes, à sensibilidade e melhor resposta do tumor a pequenas moléculas inibidoras de tirosina quinases (Figura 1), tal como Erlotinib e Gefitinib (22-26). 1.3.2. KRASO gene KRAS (do inglês Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) codifica uma proteína de mesmo nome, membro da superfamília das pequenas GTPases e que atua como mensagem secundário envolvido na proliferação celular (28, 29). Esta proteína desempenha funções oncogênicas e tem sido associada a malignidades diversas, incluindo carcinoma de pâncreas, colorretal e de pulmão (29-31). As mutações do gene KRAS são mais comuns no subtipo NSCLC e cerca de um terço dos pacientes com este subtipo tumoral são carreadores de mutações somáticas presentes nos códons 12 e 13 deste gene (32). Ao contrário das mutações do gene EGFR, as mutações no gene KRAS são associadas a pacientes fumantes e prognóstico desfavorável. (33, 34). Até o momento, não há terapia alvo eficaz para os pacientes carreadores de mutações no gene KRAS, no entanto, estes pacientes parecem não se beneficiam das terapias com inibidores de tirosina quinase (35). Além disso, pacientes com mutações nos genes EGFR e KRAS concomitantemente não apresentaram benefícios com o tratamento dos inibidores do EGFR (36). 1.3.3. EML-ALKA quinase de linfoma anaplásico (ALK, do inglês Anaplastic lymphoma kinase) é um receptor tirosina quinase com funções biológicas ainda não esclarecidas. O gene ALK, codificador desta quinase, é normalmente expresso no intestino delgado, testículos e sistema nervoso central de humanos adultos (37). A translocação do gene, resultado da fusão de pequenas inversões do cromossomo 2p, tem atividades oncogênicas em NSCLC (38). A frequência desta alteração nos pacientes com este subtipo do câncer de pulmão é inferior a 15% (38-40). O gene codificador da proteína equinoderma associada a microtubulos do tipo 4 (EML4, do inglês echinoderm microtubule associated protein like 4) localiza-se no braço curto do cromossomo 2 próximo da localização do gene ALK (38). Uma inversão no braço curto do cromossomo 2 nos loci 21 e 23 resulta em um gene composto pela fusão do gene ALK com o gene EML4. A proteína quinase codificada por este "novo" gene é altamente oncogênica e é responsável pela origem dos NSCLC em um subgrupo de pacientes (38). A presença da translocação ALK-EML4 e a presença de

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancelbarretos.com.br



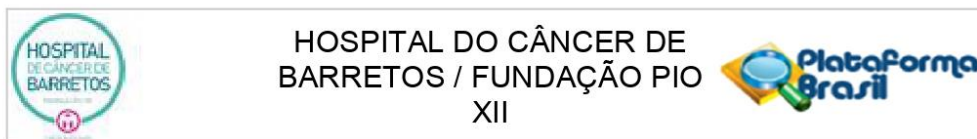
Continuação do Parecer: 2.892.263

mutações nos genes EGFR e KRAS são, geralmente, mutualmente exclusivas (39, 40). Por esta razão e também pela frequência da translocação ALK-EML4 ser inferior à presença de mutações dos genes EGFR e KRAS, recomenda-se realizar a investigação da translocação ALK-EML4 em casos que mutações nos genes EGFR e KRAS forem ausentes (41). O crizotinib, um inibidor oral do domínio de tirosina quinase de ALK, mostrou-se eficaz em diminuir a atividade tumoral em linhagens celulares e em prolongar a sobrevida global e a sobrevida livre de progressão da doença em pacientes com NSCLC carreando translocações do gene ALK (42, 43). Portanto, a detecção das translocações de ALK faz-se importante para prever uma resposta clínica favorável ao crizotinib quando alterações dos genes EGFR e KRAS estão ausentes (44). Até o momento, o único teste diagnóstico para detecção dos rearranjos de ALK em NSCLC aprovado pelo FDA para uso clínico é o FISH (41). No entanto, novas tecnologias já tem sido utilizadas com o mesmo fim, inclusive com a possibilidade de se avaliar rearranjos em outros genes concomitantemente, como as fusões envolvendo os genes RET e ROS1 (45).

1.4. Biomarcadores do câncer de pulmão

Marcadores tumorais biológicos são produtos moleculares secretados pelo tecido neoplásico e caracterizado em células e fluidos corporais capazes de distinguir o que está em condição normal ou cancerosa (29, 46). Estes biomarcadores encontrados nos fluidos biológicos podem ser proteínas, RNAs, miRNAs, DNAs metilados e células tumorais circulantes. A identificação dos marcadores biológicos podem auxiliar na determinação do estadiamento tumoral, podem prever recorrência e podem auxiliar no monitoramento da resposta ao tratamento (47). Dentre os fluidos corporais, o sangue é o mais comumente utilizado em estudos para investigação de biomarcadores por ser de fácil acesso e por ser coletado dos pacientes para análises bioquímicas rotineiramente (47). Nos últimos anos, muito estudos surgiram avaliando biomarcadores em câncer de pulmão. Estes biomarcadores têm sido identificados, principalmente, com fins de prognóstico, diagnóstico, predição e detecção precoce da doença. Dentre os principais biomarcadores de câncer de pulmão destacam-se os fragmentos de citoqueratina 19 (CYFRA, do inglês Cytokeratin 19 Fragments), o antígeno carcinoembrionário (CEA, do inglês CarcinoEmbryonic Antigen), antígeno SCC, enolase neurônio-específica (NSE, do inglês Neuron-Specific Enolase), peptídeo liberador de progastrina (ProGRP, do inglês ProgastrinReleasing Peptide), EGFR, sendo este último o marcador mais importante do ponto de vista prático, devido à sua importância na terapêutica da doença, como supracitado (47). As células tumorais circulantes (CTC) estão presentes na corrente sanguínea de pacientes com tumores sólidos e desempenham um papel importante na metástase (48). O desenvolvimento de novas tecnologias, tais como os sequenciamentos de nova geração e a PCR digital, tem permitido a utilização das CTCs como biópsia líquida, em especial em tecidos tumorais

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.892.263

em que a remoção e/ou a biópsia são um desafio, como é o caso do tecido pulmonar (49, 50). Como supracitado, detecção de mutações no gene EGFR são fundamentais para o tratamento e para a predição do prognóstico dos pacientes carreadores destas mutações (26). Estas mutações foram detectadas em 84% das amostras de biópsia líquida de pacientes com NSCLC por sequenciamento de nova geração, resultado este compatível com os resultados encontrados no tecido tumoral (51). Desta forma, a identificação de mutações com papel importante na tumorigênese pulmonar, como as mutações do gene EGFR, em amostras de fácil obtenção aumenta as chances de diagnóstico mais precoce e permite o monitoramento da doença de forma menos invasiva.

HIPÓTESE:

A hipótese do presente estudo é que a identificação de biomarcadores por meio da análise do perfil molecular do câncer de pulmão poderão auxiliar na detecção precoce da doença e no monitoramento da resposta ao tratamento bem como na determinação do estadiamento tumoral e na predição de recorrência. Além disso, a identificação destes biomarcadores abrem perspectivas para novos alvos terapêuticos que poderão, no futuro, ser aplicados à prática clínica.

Objetivo da Pesquisa:

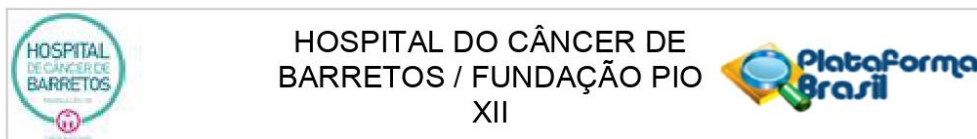
OBJETIVO PRIMÁRIO:

Elaborar o perfil molecular envolvendo mutações somáticas, rearranjos e alterações cromossômicas, expressão de miRNAs e dos principais genes envolvidos com a carcinogênese humana e correlacionar com as informações epidemiológicas e clínico-laboratoriais dos carcinomas de pulmão do Hospital de Câncer de Barretos.

OBJETIVO SECUNDÁRIO:

- i. Realizar o perfil mutacional somático das amostras com câncer de pulmão em estágios iniciais (n=200) por exoma;
- ii. Realizar o estudo de rearranjos (ALK, RET e ROS1) e alterações cromossômicas (CNV) por NanoString em 100 casos de câncer de pulmão;
- iii. Realizar o perfil de expressão gênica do painel PanCancer (770 genes) e de miRNAs (800 alvos) por NanoString em 100 casos de câncer de pulmão e 20 controles normais;
- iv. Levantamento sociodemográfico e clinicopatológico dos 100 casos a serem avaliados por meio da análise de prontuários;

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	CEP: 14.784-400
Bairro: Dr. Paulo Prata	
UF: SP	Município: BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600
	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.892.263

- v. Correlacionar os achados moleculares com os achados sociodemográficos e clinicopatológicos;
- vi. Detectar as mutações e microRNAs mais frequentes identificadas pelo exoma em biópsia líquida destes pacientes por NGS e PCR digital.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS:

Não há risco de identificação de alterações hereditárias (mutações germinativas) e, portanto, não há possibilidade de encontrar, acidentalmente, nenhum tipo de câncer hereditário. O risco principal deste estudo é a quebra acidental de sigilo, que os pesquisadores cuidadosamente vão procurar minimizar, tomando todo o cuidado necessário e utilizando medidas de segurança quanto à confidencialidade, privacidade e armazenamento de dados. O estudo é considerado de baixo risco para o paciente por não envolver procedimentos invasivos e por se tratar de um estudo retrospectivo. A análise molecular será realizada retrospectivamente nos tecidos de amostras de carcinomas de pulmão congeladas e em tecidos de lesões incluídos em blocos de parafina bem como tecidos de pulmão normal incluídos em parafina provenientes de indivíduos que tiveram morte súbita ou acidental.

BENEFÍCIOS:

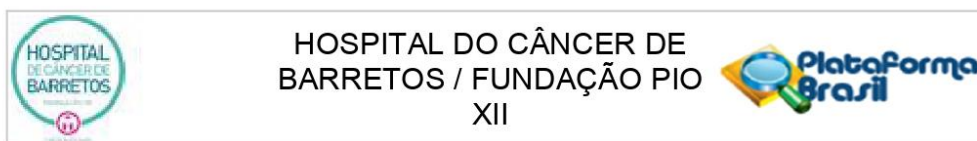
Não há benefício para o paciente participante do estudo. O potencial benefício do estudo para a sociedade é que por meio do perfil de mutações somáticas, possa ser caracterizado molecularmente o tipo de tumor, o que pode propiciar o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos futuros. Além disso, este estudo pode possibilitar subsídios para uma avaliação dos fatores e profissões de risco de desenvolver o câncer de pulmão.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente submissão trata-se de E5 ao projeto para aprovação dos seguintes documentos:

- Perfil_Molecular_do_Cancer_de_Pulmao_HCB_EMENDA_6.docx;
- Formulario_EMENDA_Ago2018.pdf;
- Formulario_EMENDA_Ago2018.docx;
- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1211283_E5.pdf

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	CEP: 14.784-400
Bairro: Dr. Paulo Prata	
UF: SP	Município: BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600
	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.892.263

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados adequadamente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 1139/2016, e:

- Aprovou a emenda ao estudo, submetida em 30/08/2018;

Após análise do(s) documento(s) supracitado(s), o Comitê faz a seguinte recomendação:

- O Estudo deve Continuar;
- O Estudo deve ser Interrompido;
- O Estudo está Finalizado;
- Solicita-se Esclarecimento;

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1211283_E5.pdf	30/08/2018 09:49:25		Aceito
Outros	Formulario_EMENDA_Ago2018.docx	30/08/2018 09:48:17	Leticia Ferro Leal	Aceito
Outros	Formulario_EMENDA_Ago2018.pdf	30/08/2018 09:47:59	Leticia Ferro Leal	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Perfil_Molecular_do_Cancer_de_Pulmao_HCB_EMENDA_6.docx	30/08/2018 09:46:04	Leticia Ferro Leal	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_n200_Signed.pdf	24/10/2017 11:09:10	Leticia Ferro Leal	Aceito
Outros	Cadastro_Projeto_n200.pdf	24/10/2017 11:08:02	Leticia Ferro Leal	Aceito

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE
BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO
XII

Continuação do Parecer: 2.892.263

Outros	Levantamento_material_biologico.xlsx	13/06/2016 10:24:22	Leticia Ferro Leal	Aceito
Outros	Declaracao_ciencia_estudo_Chefia.pdf	29/04/2016 12:52:43	Leticia Ferro Leal	Aceito
Outros	Declaracao_Fonte_de_Financiamento_PioXII.pdf	25/04/2016 14:00:26	Leticia Ferro Leal	Aceito
Outros	Declaracao_Responsabilidade_Pesquisador.pdf	25/04/2016 10:36:11	Leticia Ferro Leal	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 13 de Setembro de 2018

Assinado por:
Maicon Fernando Zanon da Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hccancerbarretos.com.br

Anexo C – Artigo Científico

Declaro que o artigo científico está em fase de construção.